



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

NAIRANE DA SILVA ROSA LEÃO

**Avaliação do potencial biotecnológico do
Aspergillus spp. para produção de biomassa
como recurso renovável na geração de energia**

Recife
2015

NAIRANE DA SILVA ROSA LEÃO

**Avaliação do potencial biotecnológico do
Aspergillus spp. para produção de biomassa
como recurso renovável na geração de energia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente.

ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Kaoru Okada

CO-ORIENTADOR: Prof^o Dr^o. Ricardo Kenji Shiosaki

Recife

2015

Avaliação do potencial biotecnológico do *Aspergillus* spp. para produção de biomassa como recurso renovável na geração de energia

Nairane da Silva Rosa Leão

Examinadores:

Prof^a. Dr^a. Kaoru Okada
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Norma Buarque de Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof^a Dr. Carlos Alberto Alves da Silva
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Defendida em ___/___/_____

Coordenadora: Prof^a. Dr^a. Clarissa Daisy Costa Albuquerque

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho não representa apenas a conclusão de um curso, é também um momento ímpar para reflexão de tudo que vivenciamos ao longo dessa caminhada. Então, cabe agradecer a todas as pessoas que contribuíram de forma positiva para esta conquista:

A Deus, por estar sempre presente iluminando meus caminhos, dando sentido a todos os passos de minha vida;

Aos meus pais, Luiz Gonzaga e Helena pelos valores morais e humanos que formaram meu ser e pelas palavras de incentivo sempre acreditando na minha capacidade e na conclusão de mais uma etapa da minha vida;

Ao meu esposo, companheiro de todas as horas, Antônio Felipe Leão Nunes, pela amizade, carinho, amor, compreensão, pelas palavras sempre de força que serviram de estímulos e tranquilidade para a continuidade desta jornada;

À minha orientadora, Prof^a Dra Kaoru Okada, pela orientação, ensinamentos, incentivo, paciência, parceria, amizade e confiança constante;

Ao meu co-orientador Ricardo Kenji Shiosaki, pela disponibilidade e contribuição.

À Universidade Católica de Pernambuco, em especial a coordenação geral de pós-graduação e ao Reitor Pe. Pedro Rubens Ferreira Oliveira, S.J., pela realização do curso;

À Prof^a Dr^a Galba Maria de Campos Takaki, Coordenadora do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnológicas – NPCIAMB/UNICAP, pela sempre amável disponibilidade;

A Roberta Leite Santos Reis pelo compartilhamento dos momentos de estudo, alegrias, angústias e principalmente pela amizade construída;

Aos amigos do NPCIAMB: Adriana Souza, Grayce Kelly Barbosa, Jaceline Negreiros, Daylin Rubio Ribeaux, Dayana Montero Rodriguez, Marcos Luna, Kyrialle Morant Vasconcelos, Manuela Lins, pela deliciosa convivência, trocas intelectuais e amizade;

Aos colegas de turma e professores do Mestrado pela troca de conhecimentos e convívio, amizade, aprendizado e experiência na concretização desta jornada acadêmica;

Aos técnicos de laboratório André Felipe Santos de Lima, e em especial, Severino Humberto de Almeida pela total disponibilidade e contribuição para a realização desse trabalho;

Às demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho;

À CAPES pelo fomento para a realização da Pesquisa, como também pela bolsa concedida para a realização do Mestrado.

À todos meu carinho, respeito e admiração, muito obrigada!.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
CAPÍTULO I	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Biomassa: Fonte de energia renovável	15
3.2 Biocombustíveis: energia alternativa e sustentável.....	19
3.3 Lipídeos.....	25
3.4 Bioma Caatinga.....	28
3.5 Micro-organismos oleaginosos.....	30
3.6 O gênero <i>Aspergillus</i> e aplicação biotecnológica	34
3.7 Utilização de resíduos agroindustriais	37
3.7.1 <i>Milhocina</i>	39
3.7.2 <i>Melaço de cana-de-açúcar</i>	41
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
CAPÍTULO II	57
Seleção de amostras de <i>Aspergillus</i> spp. para produção de lipídeos intracelulares com aplicação biotecnológica	58
1 INTRODUÇÃO	59
2 MATERIAL E MÉTODOS	60
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
REFERÊNCIAS.....	63
CAPÍTULO III	65
<i>Aspergillus parasiticus</i> UCP 1182 como recurso natural renovável para produção de energia através da biomassa	66
PARTE EXPERIMENTAL	68
RESULTADOS E DISCUSSÃO	72

Produção de Biomassa e Lipídeos Totais em meio Czapek Líquido.....	72
Planejamento Fatorial e avaliação estatística da influência dos meios residuais na produção de lipídeos totais.....	73
Caracterização dos Ácidos Graxos	74
Atividade Antioxidante	77
CONCLUSÕES	79
AGRADECIMENTOS	79
REFERÊNCIAS	80
CAPÍTULO IV	66
CONCLUSÕES GERAIS	84
ANEXOS	86

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1.** A evolução dos biocombustíveis no Brasil22
- Figura 2.** Matriz energética brasileira ano de 2010 e 2020 %.....24
- Figura 3.** Representação esquemática de uma estrutura de lipídeos, associações anfipáticas de uma micela.....26
- Figura 4.** Alguns exemplos de compostos da classe dos lipídeos (a) Carotenoides; (b) Esterol; (C) ácido graxo; (d) cera.26
- Figura 5.** Principais ácidos graxos presentes em óleos e gorduras: (i) saturados (a) palmítico com 16 carbonos; b, esteárico com 18 carbonos); (ii) insaturados com 18 carbonos (c, oleico com uma ligação dupla; d, linoleico com duas ligações duplas; e, linolênico com 3 ligações duplas).....27
- Figura 6.** Mapa do bioma caatinga e seus respectivos estados28
- Figura 7.** Biossíntese lipídica devido excesso de citrato como uma consequência da limitação de nitrogênio.33
- Figura 8.** Estruturas reprodutivas assexuada de *Aspergillus parasiticus* e conidióforo, célula conidiogênica (fiálides) e conidiósporos (A). Conidiogênese blástica-fialídica. Conidiósporos *A. flavus* em processo de germinação e produção de conidióforo (B).35

Capítulo II

- Figura 1.** Microcultivo de *Aspergillus parasiticus*, observados em Microscopia Óptica objetiva 40x. conidióforo, célula conidiogênica (fiálides) e conidiósporos, vesícula bem contornada(A) e (B). Hifa visivelmente septada (C).62
- Figura 2.** Coloração dos corpos lipídicos pela técnica Sudan Black, em hifa de *Aspergillus parasiticus*.....63

Capítulo III

- Figura 1.** Curva de crescimento do *Aspergillus parasiticus* UCP 1182 em meio alternativo.....72
- Figura 2.** Diagrama de Pareto para produção de Lipídeos totais em meio alternativo.74
- Figura 3.**Gráfico da curva de crescimento atividade antioxidante78

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Distribuição da biomassa vegetal oleaginoso, utilizados na produção de Biodiesel..... 18

Tabela 2. Composição de aminoácidos, vitaminas e minerais encontrados em uma solução concentrada de milhocina.40

Capítulo II

Tabela 1. Relação de biomassa das amostras de *Aspergillus*, em meio produção Czapek liquido.....61

Tabela 2. *Aspergillus* com melhores % de lipídeos totais, utilizando metodologias: FOLCH (1957) modificado por BLIGH; DYER (1959) e MANOCHA et al., (1980). 62

Capítulo III

Tabela 1. Planejamento fatorial completo 2^3 com variáveis independentes: pH, concentrações de melação e Milhocina, para produção de lipídeos totais..... 70

Tabela 2. Planejamento fatorial completo 2^3 com variáveis independentes: pH, biomassa e Lipídeos e variáveis dependentes: biomassa e concentrações de lipídeos 73

Tabela 3. Composição dos ácidos graxos extraídos da biomassa cultivados em meio Czapek 75

Tabela 4. Composição de ácidos graxos identificados no lipídeo extraído da biomassa liofilizada de *Aspergillus parasiticus* cultivado em meio melação de cana-de-açúcar e milhocina por 96h. 76

Tabela 5. Concentração do extrato e atividade antioxidante do *Aspergillus parasiticus* 77

RESUMO

Nas últimas três décadas, a busca por combustíveis alternativos e renováveis teve maior evidência no cenário mundial, devido as crescentes preocupações ambientais e com a perspectiva de esgotamento de fontes energéticas de origem fóssil. A produção de biomassa de micro-organismos tem sido sugerida como adequada para a conversão em energia. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico de amostras de *Aspergillus* spp. isolados da Caatinga através da seleção entre dez amostras do gênero, sendo *Aspergillus niger* (3) *A. flavus* (3), e *A. parasiticus* (4). Foram realizadas extrações dos lipídeos totais e a amostra com melhor percentual realizou-se a cinética de crescimento, caracterização dos ácidos graxos e atividade antioxidante da amostra selecionada. As amostras foram cultivadas em meio sintético Czapek líquido, e em meio alternativo (milhocina e melação de cana-de-açúcar), utilizando o planejamento fatorial completo 2^3 . Os lipídeos totais foram extraídos utilizando combinação binária de clorofórmio e metanol. Foram obtidas quantidades de lipídeos totais acima de 20% em ambos meios de cultura, caracterizando o gênero *Aspergillus* como oleaginoso. Os resultados indicaram que o *Aspergillus parasiticus* UCP 1182, obteve uma produção de 2,03 g/L de biomassa e uma produção de 44,2% de lipídeos totais em Meio Czapek, enquanto na produção em meio alternativo (melaço de cana-de-açúcar e Milhocina) obteve no ensaio (8) 2,83g de biomassa em 48,9% de lipídeos totais. O perfil dos ácidos graxos cultivado em meio Czapek indicou a presença de ácido graxos linolênico (36,54%) e oleico (33,95%). E no meio alternativo o composto favoreceu a produção do ácido graxo linolênico (28,66%) e ácido linolênico (40%). Na atividade oxidante do *A. parasiticus* calculada em regressão linear, obteve o EC50 de 4,06774 µg/mL do extrato lipídico. Assim, os resultados obtidos com *Aspergillus parasiticus* UCP 1182, sugerem como fonte de lipídeos importantes para seu emprego em processos biotecnológico, como aplicação em biocombustíveis e fármacos.

Palavras-Chaves: Resíduos agroindustriais, lipídeos, melaço de cana de açúcar, milhocina, fungo oleaginoso, combustível de 2ª geração.

ABSTRACT

In the last three decades, the search for alternative and renewable fuels had greater evidence on the world stage, due to growing environmental concerns and the prospect of depletion of fossil energy sources. The biomass of microorganisms has been suggested as suitable for conversion to energy. This study aimed to assess the biotechnological potential of *Aspergillus* spp. isolated from Caatinga through the selection of ten genre samples, *Aspergillus niger* (3), *A. flavus* (3), and *A. parasiticus* (4). Of total lipid extractions were performed and the sample with better percentage held the growth kinetics, characterization of fatty acids and antioxidant activity of selected sample. Samples were grown in synthetic medium Czapek liquid, and reciprocating means (molasses and corn steep liquor sugarcane), using the complete factorial design 23. The total lipids were extracted using binary combination of chloroform and methanol. Total lipid amounts were obtained over 20% in both culture media, featuring the genus *Aspergillus* as oleaginous. The results indicated that the *Aspergillus parasiticus* CPU 1132, an output obtained from 2.03 g / L of biomass production and a 44.2% total lipids in Medium Czapek while in alternative production medium (sugar cane molasses and corn steep liquor) obtained in the trial (8) 2,83g biomass to 48.9% of total lipids. The fatty acid profile grown in Czapek medium indicated the presence of acid g [[raxos linoleic (36.54%) and oleic (33.95%). And alternative way to favor the production of the compound linolenic acid (28.66%) and linoleic acid (40%). In oxidant activity of *Aspergillus parasiticus*, calculated in linear regression, got the EC50 4.06774 mg / mL of lipid extract. This the results obtained from *Aspergillus parasiticus* CPU 1182, suggest important as a source of lipids for its use in biotechnological processes such as application and biofuels drugs.

Keywords: Agro-industrial residues, lipids, sugar cane molasses, corn steep liquor, oleaginous fungus, 2nd generation fuel.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com o meio ambiente aliada à necessidade de crescimento econômico incessante, torna inadiável o desenvolvimento sustentável, as inovações tecnológicas e a utilização cada vez maior de energias renováveis, procurando articular, de forma equilibrada, o crescimento econômico com a equidade social e a proteção ambiental, substituindo principalmente os combustíveis de origem fóssil, os quais, quando queimados, liberam gases causadores de efeito estufa, as maiores fontes de emissão de poluentes causadores do aquecimento global (MENDONÇA, 2007, PIVOTO et al., 2011; PRETO, 2012; PELÁ, 2014; AQUINO et al. 2014; ARAUJO RAMOS, 2015; ZUNIGA et al.2015).

Considerando que o Brasil tem um imenso potencial usufruindo de uma diversidade de opções de matérias-primas para produção de biocombustíveis derivados de biomassa renovável, neste caso os micro-organismos oleaginosos, os quais possuem a capacidade de produzir mais de 20% de seu peso em óleos unicelulares compostos triacilgliceróis, que contêm ácidos graxos como o ácido palmítico, esteárico e oleico que são bem adequados para aplicação do biodiesel (KOSA; RAGAUSKAS, 2011; MENDES et al. 2014).

A conversão de energia química da biomassa, em energia útil, é considerado um processo limpo de produção de energia, sendo uma fonte energética tratada como natural, que produz espontaneamente, pela natureza, sem nenhuma intervenção humana não provocando impactos ambientais (BUCKLEY; PAREDE, 2006; FERNÁNDEZ, 2009; LIANG; JIANG, 2013; AQUINO et al.2014).

O estudo de micro-organismos para a produção de lipídeos tem se tornado uma alternativa para a substituição de fontes convencionais de óleos e gorduras. Uma vez que estes lipídeos apresentam composição semelhante aos óleos vegetais, poderiam ser empregados para fins alimentares, na produção de compostos específicos, como produtos farmacêuticos, combustíveis alternativos como matéria-prima para o biodiesel, sendo fontes facilmente renováveis e reprodutíveis quando comparadas com outras fontes naturais como plantas e animais (CELLIGOI, 1993; PEREIRA et al.2012; GOMES et a. 2013; SPECIAN et al.2014, ABREU et al. 2015; ALVIM et al. 2015).

Atualmente são crescentes os estudos que objetivam a obtenção de lipídeos em micro-organismos sob algumas condições de cultivo especial em bioprocessos sólidos ou submersos, com o objetivo de produção de biocompostos aplicáveis em inúmeros setores industriais (LIANG; JIANG, 2013; ZEN et al., 2014; MUNIRAJ et al., 2015).

O emprego de resíduos agroindustriais, como substratos fermentescíveis é uma alternativa para minimizar o problema de altos custos para aquisição de bioprodutos de origem microbiano, e que também colaboram com práticas biotecnológicas mais sustentáveis (ALVIRA et al., 2010; MURUGAN et al., 2011; DANIELS, 2013; RODRIGUES et al., 2014).

Neste contexto, busca-se, ampliar e estimular o consumo das energias alternativas, o biodiesel proveniente do *Aspergillus* spp. traduzindo-se num incontestável fator para o desenvolvimento, principalmente objetivando a preservação e a conservação do meio ambiente, empregando resíduos agroindustriais, melaço de cana de açúcar e milhocina, com a finalidade de obter fonte lipídica de baixo custo com propriedades favoráveis para a produção de energia e bioprodutos, minimizando os custos de produção, possibilitando a ampliação do processo no futuro.

A milhocina é um subproduto gerado durante o processo de maceração do milho, considerada uma excelente fonte de carbono e/ou nitrogênio para os micro-organismos por conter em sua composição aminoácidos, vitaminas e sais minerais e outros nutrientes. A utilização de fonte de nitrogênio para o crescimento microbiano e produção de metabólitos torna-se essencial, pois está intimamente relacionado ao metabolismo dos micro-organismos (SILVEIRA, 2001; AMARAL 2010; DANIELS 2013; SANTOS et al., 2014).

O melaço de cana-de-açúcar tem sido alvo de vários estudos na produção de biomoléculas energéticas, considerando a importância da fonte de carbono utilizada, na aplicação de subprodutos agroindustriais (CAZETTA; CELLIGOI, 2005. OLIVEIRA et al., 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o potencial de micro-organismos do gênero *Aspergillus* isolados da região do semi-árido do estado de Pernambuco, como recurso natural renovável de energia através da produção de biomassa microbiana.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Identificar amostras de fungos do gênero *Aspergillus*, isolados da região do semi-árido do estado de Pernambuco, produtores de lipídeos através da coloração Sudan Black;
- ✓ Selecionar amostras com elevados percentuais cumulativas de biomassa e lipídeos em meio de cultivo tradicional;
- ✓ Utilizar meios de produção empregando resíduos agroindustriais, (milhocina e melaço de cana-de-açúcar) como substratos alternativos de baixo custo, para produção de biomassa e lipídeos totais;
- ✓ Realizar estudo cinético da melhor condição produtora de lipídeos em meios alternativos;
- ✓ Estudar a influência de fatores: pH, substratos agroindustriais e extração de lipídeos totais, utilizando planejamento fatorial 2³ na produção da biomassa e acumulação de lipídeos;
- ✓ Realizar a caracterização dos ácidos graxos através de cromatografia gasosa;
- ✓ Verificar a atividade oxidante do *Aspergillus* spp. melhor produtor de lipídeos totais.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Biomassa: Fonte de energia renovável

A energia detém desde a antiguidade, um papel fundamental no desenvolvimento social e econômico da humanidade. Esse recurso proporciona conforto pessoal, mobilidade e riqueza, a nível industrial e comercial (EEA, 2008). Nos últimos anos, está se tornando um poderoso vetor de dinamismo da economia mundial, como base da inovação no século XXI. A evolução dos conhecimentos em biologia contribui para maior utilização da biomassa, seja na preparação e produção de matérias-primas, nas tecnologias de conversão e mesmo na obtenção de novos produtos, uma delas a obtenção energia (COUTINHO, 2011; LIANG; JIANG, 2013; ALVIM, 2015).

A bioenergia é uma das mais promissoras fontes de energias alternativas renováveis passíveis de ser inserida na matriz energética mundial e direcionada à compatibilização da expansão da oferta de energia com a mitigação das alterações climáticas, isto se deve a sua maturidade tecnológica de geração, possibilidade de exploração e desenvolvimento em abundância, além de maior competitividade em comparação às demais fontes alternativas de energia (XIA et al., 2011; SILVA, 2013; GARAY; BOUND-MILLS; GERMAN, 2014).

Chama-se biomassa a esta forma de energia transformada e armazenada de forma infinita e sem perdas, capaz de ser convertida em combustíveis gasosos, líquidos e sólidos por meio de tecnologias conhecidas. Definida do ponto de vista da geração de energia, como todo recurso renovável oriundo de organismos vivos (matéria orgânica animal, vegetal e de micro-organismos), que pode ser convertido em combustível ou utilizado na produção de energia (LEITE; LEAL, 2007; GRISOLI; COELHO; MATAI, 2010; PRIBERAM, 2013; MUNIRAJ et al., 2015).

Os avanços recentes na genética, biotecnologia, química de processos, e de engenharia estão transformando os conceitos e a conversão de biomassa renovável para combustíveis (DEY; BANERJEE; MAIT, 2011; SOUZA, 2014; JESUS, 2014).

São consideradas abordagens estratégicas no esforço da eficiência energética e de sustentar o fornecimento de energia limpa a questão de *exploração*

e *implantação* que consistem em tipos de energias de fontes não fósseis renováveis que tem potencial para produção de energia, incluindo a eólica, solar, geotérmica, hidrotérmica energia dos oceanos, energia hidrelétrica, biogás (por exemplo, gás de aterro e tratamento de águas residuais de plantas de biogás) e biomassa, a biomassa é única fonte de energia renovável que pode ser usado para produzir combustíveis líquidos (YUCHENG; PAWLOWSKI 2012).

A biomassa pode ser considerada como a fonte de energia renovável mais popular, por estar disponível de forma abundante e tecnicamente flexível. Por estas razões, a energia a partir da biomassa, em especial na forma de óleo, tem recebido crescente interesse ao redor do mundo (YUCHENG; PAWLOWSKI 2012).

As energias alternativas menos poluentes e renováveis têm sido apontadas como uma das soluções para mitigar problemas energéticos, pois a produção do século XX foi dominada por combustíveis fósseis, que representavam ainda no início do século XXI, cerca de 80% de toda energia produzida no mundo (GOLDENBERG, 2009). O uso de biomassa (fração biodegradável de produtos biogênicos, como plantas e os seus resíduo ou micro-organismos) para energia é defendida por pesquisadores pois é facilmente disponível enquanto os combustíveis fósseis como o petróleo, carvão ou gás natural, que levam milhões de anos para se formar na Terra e são finitos, sujeitos a esgotamento devido alto consumo (YUCHENG, PAWLOWSKI 2012; REIS, 2012).

É reconhecido que o recurso à biomassa é uma medida fundamental do ponto de vista dos benefícios ambientais esperados, em particular na redução das emissões de gases, com efeito, estufa (GEE), devido às suas múltiplas aplicações: produção de eletricidade, de calor e de biocombustíveis. (RAFAEL, 2012). Como grande exemplo o biodiesel, um biocombustível derivado de biomassa renovável, para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil (ANP, 2011). Tornando-se uma alternativa de energia sustentável.

Embora a matriz energética mundial ainda seja muito baseada no petróleo e seus derivados existem uma tendência e um mercado crescente para bioenergia, a

energia obtida a partir de biomassa em especial na forma de óleo, tem recebido crescente interesse ao redor do mundo (OCTAVIANO, 2011; YUCHENG; PAWLOWSKI, 2012; MUNIRAJ et al., 2015).

Frente atual situação das condições finitas e poluição através de fontes fósseis, o Brasil tem concentrado seus esforços para substituir o petróleo através de pesquisas de algumas fontes substitutivas (SILVEIRA, 2012).

Neste contexto podemos distinguir algumas fontes de energia com potencial energético considerável de biomassa tais como: a madeira e matérias-primas derivados de óleos vegetais tais como: soja, mamona, canola, girassol, amendoim e entre outros e as de origem animal, obtidas do sebo bovino, suínos, aves, além de óleos utilizados em frituras, são usados na produção de biodiesel (DELATORRE et al., 2011). E dentro do amplo aspecto compreendido pelos recursos renováveis esta a categoria formada pela biomassa residual, com o uso de resíduos agrícolas, resíduos municipais sólidos, resíduos de produção alimentar (MARQUES, 2007; (FAHD, et al., 2012; SANTOS, 2013; DANIELS, 2013).

Tratando-se de uma matéria-prima diferenciada frente às demais, a biomassa residual reúne três características e questões importantes acerca do uso da biomassa: (1) não compete com a produção de alimentos nem complementos alimentícios; (2) possui baixo custo de obtenção, uma vez que não exige esforços adicionais de produção - esta já é intrínseca a um processo pré-existente; (3) qualquer oportunidade de utilização como matéria-prima endereça a questão da disposição dos resíduos de produção (FAHD et al., 2012).

De todas as opções disponíveis, o etanol da cana-de-açúcar é o maior sucesso comercial dos combustíveis de biomassa em produção desde a década de 70 até a atualidade. O etanol da cana-de-açúcar possui balanço energético positivo e tem sido beneficiado pelo apoio de políticas governamentais em vários países (GOLDENBERG, 2009), despontando como uma alternativa ao uso do combustível fóssil, constituindo uma realidade no quadro energético mundial e, em especial, no panorama brasileiro (BRAGA; BRAGA, 2012).

O Brasil é um país de destaque na utilização de biomassa desde 1920, quando começou a utilizar o álcool como combustível. Desde então, vem ganhando destaque no que diz respeito à utilização da biomassa, com a utilização do bagaço de cana-de-açúcar, madeira de reflorestamento, resíduos florestais entre outros. A reciclagem de resíduos agrícolas e agroindustriais vem ganhando espaço cada vez maior, não simplesmente por apresentarem matérias primas de baixo custo, mas, principalmente, porque os efeitos da degradação ambiental decorrente de atividades industriais e urbanas estão atingindo níveis cada vez mais alarmantes. (DELATORRE et al., 2011).

Porém cada região do país possuem as espécies oleaginosas, permitindo a realização de pesquisas relacionada ao seu potencial para produção de biodiesel. Na tabela 1, esta representada exemplos de diferentes tipos de oleaginosas do Brasil com potencial na aplicação para biodiesel (ZHANG et al., 2003; LI, 2006; PUTTI et al., 2012).

O Brasil tem todas as condições para se tornar um grande produtor de biodiesel, possui grande potencial para produção de biomassa para fins energéticos. A mamona, o dendê, a soja, entre outras, podem ser abundantes fontes de energia e de inclusão social (LIMA, 2004).

Tabela 1. Distribuição da biomassa vegetal oleaginoso, utilizados na produção de Biodiesel.

Região	Óleos vegetais
Norte	Dendê, babaçu e soja
Nordeste	Babaçu, soja, mamona, dendê, algodão e coco
Centro-oeste	Soja, mamona, algodão, girassol, dendê e gordura animal.
Sudeste	Soja mamona, algodão, girassol.
Sul	Soja, milho, canola, girassol e algodão.

Fonte: DELATTORRE, 2011.

E mais recentemente pesquisas, tem demonstrado o potencial biotecnológico dos micro-organismos oleaginosos, como fonte de energia em muitas partes do mundo (MARQUES, 2007; SANTOS, 2013, LIANG, JIANG, 2013). O processo de obtenção de energia a partir de biomassa fúngica se baseia na capacidade que os micro-organismos têm de converter a energia química da biomassa em energia útil,

além disso, esse tipo de energia não provoca impactos ambientais negativos e nem envolve a produção de materiais perigosos (MOREIRA et al., 2014).

Estudos têm sugerido que a biomassa de micro-organismos como leveduras, bactérias e microalgas e fungos filamentosos, podem tornar-se potenciais matérias primas oleaginosas para produção de biodiesel no futuro, um grande passo para o desenvolvimento da conversão de energia através da biomassa (DEY, BANERJEE, MAIT, 2011; LIANG; JIANG, 2013; MUNIRAJ et al., 2015).

O uso de combustíveis derivados da biomassa tem sido apontado como uma alternativa técnica capaz de minimizar estes problemas. Esta massa constitui uma importante reserva de energia, pois é constituída essencialmente por hidratos de carbono, representando um recurso de carbono neutro renovável para produção de bioenergia e biomateriais (MACHADO, 2010; RAMOS et al., 2011).

As tecnologias de conversão de biomassa para formas utilizáveis comercialmente, variam em termos de escala, qualidade do combustível, tipo de biomassa e custo (GOLDEMBERG, 2009).

3.2 Biocombustíveis: energia alternativa e sustentável

A sociedade contemporânea estabeleceu o seu desenvolvimento econômico baseado na utilização intensiva de fontes energéticas de origem fóssil, modelo de desenvolvimento econômico e social, adotados por inúmeros países, fato este que vem expondo a população mundial aos reflexos catastróficos de uma exploração desordenada e insustentável do ambiente. Com isso sabemos que se mantivermos o ritmo de exploração ainda temos por alguns anos petróleo suficiente para nosso consumo. Porém, quando esta exploração atingir o seu máximo, um processo de declínio na produção será inevitável, e com isso a utilização de outros combustíveis se fará necessária, buscando fontes alternativas e renováveis de energia, as chamadas energias limpas (DELATORRE et al., 2011; SILVA et al., 2013 ZUNIGA et al., 2015).

Ao longo dos anos tem sido notória uma crescente alteração do estado natural do clima, fomentada por um crescente incremento das emissões de diversos

gases que potenciam o efeito de estufa. O consumo de combustíveis fósseis contribui em larga escala para o incremento das emissões de dióxido de carbono na atmosfera, como resultado do processo de conversão energética, a combustão. Neste processo são ainda libertados poluentes atmosféricos como o dióxido de enxofre (SO₂), e as partículas (PM10) que são tipo de partículas inaláveis, de diâmetro inferior a 10 micrômetros, bem como o metano (CH₄), o óxido nitroso (N₂O) e os compostos halogenados (EEA, 2008, 2011; PEREIRA et al., 2014).

A preocupação ambiental tem sido o ponto central de grandes discussões ao redor do mundo, principalmente no que diz respeito às emissões de poluentes e ao desequilíbrio nos ciclos, como o do carbono e o do enxofre na atmosfera, causadas pelos combustíveis fósseis. (LEITE, LEAL 2007; DELATORRE et al., 2011; ALMEIDA, AZEITEIRO, 2014).

Em estudos realizados pelo plano Nacional de Agroenergia da Embrapa (2011), a crise é uma questão “global” considerando que as reservas de combustíveis fósseis estão diminuindo gradualmente, e nos defrontamos com a necessidade de alterar substancialmente a matriz energética, intensificando o investimento e o uso de energia a partir de fontes alternativas, preferencialmente renováveis. Neste contexto o *Desenvolvimento Sustentável* surge como um novo paradigma, dentro de uma visão holística que tem como sustentáculo três principais dimensões: o social, o ambiental e o econômico. E o desafio está na mudança da relação social com o meio ambiente. Para isso, é necessária uma mudança de valores, fundamentada na valorização da diversidade cultural e étnica, uma nova maneira de pensar e agir comprometida acima de tudo com o “outro” e que exige transformação nas ações antrópicas locais que vão interferir em dimensões globais. (LEFF, 2001; SEBRAE, 2009; MACHADO, 2010).

Durante a década de 70, para fazer face às crescentes despesas com a conta do petróleo, o Brasil, ao invés de realizar um ajuste estrutural, recorreu ao endividamento externo, então barato e abundante. O desequilíbrio resultante perpetuou-se na década uma grave crise do petróleo, a economia das grandes nações foi atingida por um aumento de 400% do petróleo, clima de perplexidade, um marco na história do século XX e teve um papel central para a detonação de um colapso econômico mundial. A partir desse momento, o mundo passou a refletir

sobre a questão energética e medidas foram adotadas por diversos países para conter a dependência da importação do petróleo (MARTINS FILHO, 1996; PEREIRA, 2008), ocasionando assim uma série de mudanças econômicas e sociais.

Entre os anos de 1975 e 1989, foi um momento em que muitos países impulsionaram a pesquisa e o desenvolvimento de fontes alternativas de energia, desenvolvendo programas para obtenção de combustíveis a partir de biomassa, o Pró-álcool e o Pró-óleo, favorecendo a qualidade do meio ambiente com a redução de emissões de SO₂, CO₂. O etanol vem sendo usado como combustível no Brasil desde os anos 1920, mas foi somente com o advento do Proálcool, em novembro de 1975, que seu papel ficou claramente definido a longo prazo, permitindo que o setor privado investisse maciçamente no aumento de produção. Os biocombustíveis em uso comercial no mundo são o etanol e o biodiesel (LEITE; LEAL, 2007; ALVES, 2012; SILVEIRA, 2012).

Surgindo assim, os biocombustíveis, fontes de energias renováveis, derivados de produtos agrícolas como a cana-de-açúcar, plantas oleaginosas, biomassa florestal e outras fontes de matéria orgânica. Tornando maior visibilidade o uso de biocombustíveis, pois proporciona um alto ganho ambiental para o planeta, porque contribui com a diminuição da poluição proveniente do efeito estufa além de ser uma fonte limpa e renovável de energia que gera emprego e renda, contribuindo assim com a inclusão social (ALVES, 2012).

Em 2004 foi lançado o Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel (PNPB), que visa estimular a produção viável de biocombustíveis, a introdução dos biocombustíveis derivados de óleos e gorduras na matriz energética brasileira pela Lei 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Com esta Lei, estava previsto o uso opcional de mistura de 2 % de biocombustível ao diesel de petróleo chamado de B2. Em 2008 o uso de do B2 tornou-se obrigatório nos postos de todo o país, e no mesmo ano começou a utilização de 3 % em volume na mistura com o diesel, chamado de B3. Em 2010 passou-se para 5 % de biodiesel na mistura com o diesel (B5), mistura esta que continua em vigor no Brasil (ANP, 2011).

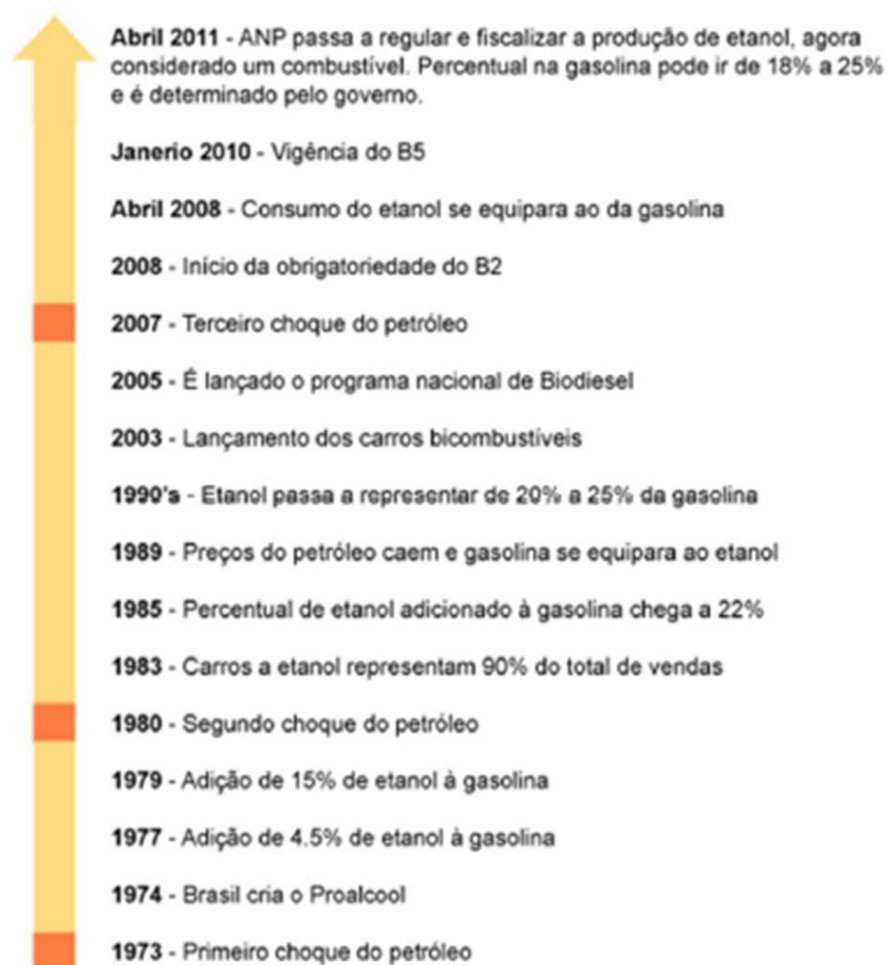
Bem como o Brasil tem também potencial para produzir o etanol de segunda geração feito através do bagaço da cana-de-açúcar em larga escala, pois há

matéria-prima em abundância com fácil acessibilidade, sendo capaz de competir com outros países (UNICA, 2013; ARAÚJO et al., 2014).

O biodiesel compõe, junto com o etanol, importante oferta para o segmento de combustíveis. Ambos são denominados de biocombustíveis por serem derivados de biomassa (matéria orgânica de origem vegetal ou animal que pode ser utilizada para a produção de energia), contendo, no entanto, menos compostos poluentes, além de serem sustentáveis (MENDES et al., 2014).

A figura 1, reporta a evolução dos biocombustíveis no Brasil, trazendo consigo uma reflexão a cerca das crises referentes ao uso do petróleo, assim como, ao advento da produção e de políticas favoráveis aos biocombustíveis.

Figura 1. A evolução dos biocombustíveis no Brasil



Fonte: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, 2011.

A utilização de biodiesel é uma alternativa aos combustíveis convencionais, pois possui propriedades físico-químicas e térmicas semelhantes às do gásóleo/Biodiesel. O biodiesel pode ser utilizado diretamente em motores diesel, desde que os materiais das juntas, vedações e tubagens sejam compatíveis, ou em mistura com o gásóleo em proporções que podem ir até 20% sem necessidade de qualquer alteração no motor (PRETO, 2012 ; LIANG, JIANG, 2013).

Desde 1º de janeiro de 2010, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém 5% de biodiesel. Esta regra foi estabelecida pela Resolução n. 6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), que aumentou de 4% para 5% o percentual obrigatório de mistura de biodiesel ao óleo diesel. Estima-se que se atingirá também o B100, como hoje acontece com o E100, nos automóveis de combustível duplo (*Flexible-Fuel Vehicle – FFV*) (ITURRA, 2007).

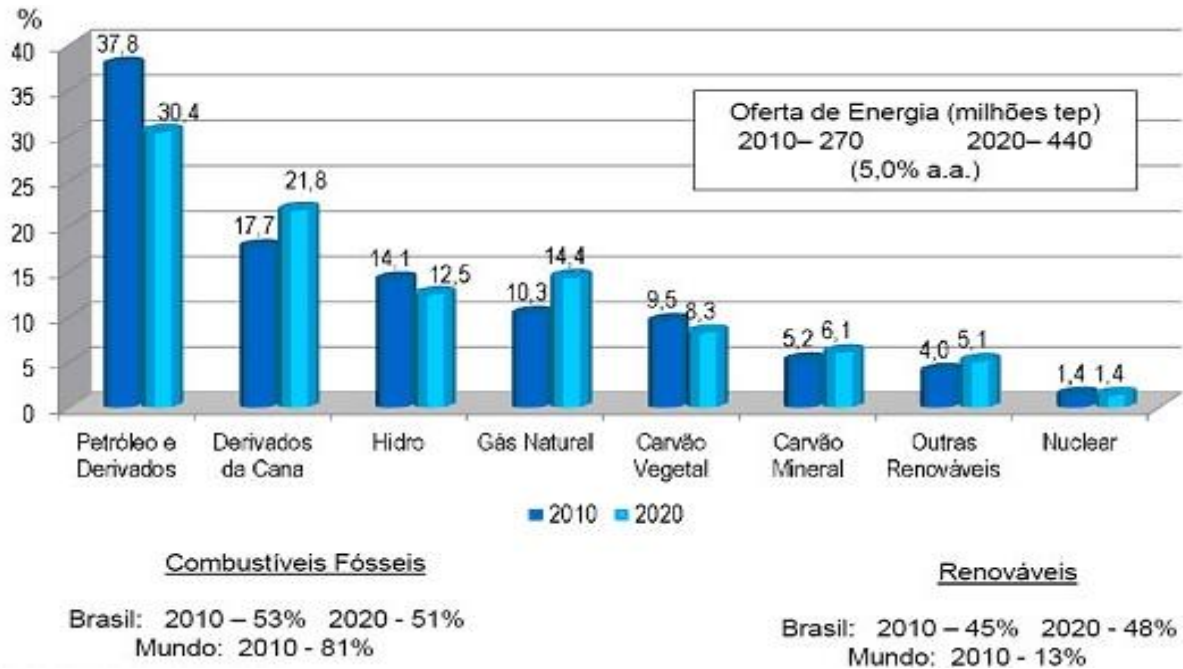
A substituição do uso de uma parte do petróleo por biocombustíveis, preferencialmente, o biodiesel, o bio-óleo e etanol, se tornou “peça-chave” para os países que dependem do petróleo. Por apresentarem um baixíssimo teor de enxofre e por contribuírem satisfatoriamente com a diminuição do estoque de dióxido de carbono atmosférico, diversos países estão produzindo comercialmente estes biocombustíveis e estimulando o seu desenvolvimento em escala industrial para o uso em veículos do ciclo-diesel (ALVES, 2012).

Quando comparado ao óleo diesel derivado de petróleo, o biodiesel pode reduzir em 78% as emissões de gás carbônico, considerando-se a reabsorção pelas plantas. Além disso, reduz em 90% as emissões de fumaça e praticamente elimina as emissões de óxido de enxofre. É importante frisar que o biodiesel pode ser usado em qualquer motor de ciclo diesel, com pouca ou nenhuma necessidade de adaptação (LIMA 2004). Inclusive o Brasil pretende consolidar técnicas de produção de biocombustíveis incluindo o biodiesel, com domínio de novos processos e fontes de biomassas não usadas no consumo humano (FINEP, 2013).

Como política e estratégia energética, o Brasil procura diversificar as fontes de energia, buscando fortalecer a participação de fontes renováveis no abastecimento do mercado interno, como forma de prover segurança energética de forma sustentável (BRASIL, 2006). A matriz energética brasileira está representada na

figura 2, no qual se observa um aumento do uso de energias renováveis e uma decrescente queda nos combustíveis fósseis.

Figura 2. Matriz energética brasileira ano de 2010 e 2020 %



FONTE: Ministério de Minas e Energia / 2012

Para o nosso país, é de primeira necessidade o desenvolvimento de novas tecnologias de produção de biocombustíveis, já que o mundo vive em um momento de instabilidade política que pode diversificar a matriz energética, modificando substancialmente a produção de óleo diesel. A produção e o uso em larga escala do biodiesel no país podem promover ganhos econômicos e sociais, como a geração de empregos e a melhoria da qualidade do ar. O biodiesel pode substituir diretamente o óleo diesel, sem que seja necessária qualquer alteração nos motores do ciclo diesel atuais (ALVES, 2012).

A Indústria de biodiesel tem sido fortemente restringida pela escassez de material lipídico, fornecimento de matéria-prima e a busca de novos recursos de lipídeos é a questão-chave para a sobrevivência da indústria de biodiesel. Entre as várias opções, lipídeos obtida de biomassa microbiana fornecida uma opção relativamente prático comparando a outros métodos (KOBBLITZ et al., 2006; LIANG, JIANG, 2013; MUNIRAJ et al., 2015). Pois micro-organismos oleaginosos,

rapidamente acumulam lipídeos intracelulares com título elevado em caldo de fermentação (RATLEDGE, WYNN 2002; LIANG, JIANG, 2013; TSURKAN, et al 2015).

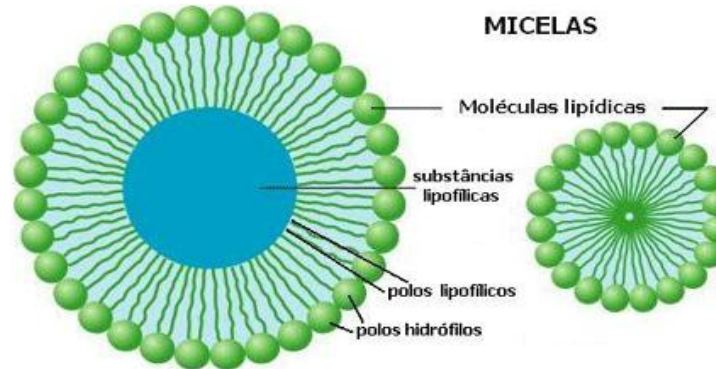
A produção de biocombustíveis baseada na biomassa fúngica surgiu como uma abordagem importante para permitir a independência energética, reduzindo emissões de gases do efeito estufa, revitalizando comunidades rurais e melhorando o desenvolvimento econômico sustentável, (XIA et al., 2011; GARAY, BOUND-MILLS, GERMAN, 2014; MUNIRAJ et al., 2015).

3.3 Lipídeos

Os lipídeos são um grupo conhecido como óleos e gorduras e seus derivados teve uma importância ímpar na história da humanidade. Este grupo se caracteriza por ter como principais componentes ácidos graxos e seus derivados. Essas substâncias estão entre os primeiros insumos naturais que o homem usou com fins não alimentares, tanto na forma natural como a partir de modificações químicas. Por exemplo, desde a civilização egípcia até o Século XIX os óleos e gorduras eram uma das principais fontes de combustíveis líquidos para uso em sistemas de iluminação, como as lamparinas, ou de lubrificantes para engrenagens mecânicas (RAMALHO; SUAREZ, 2013).

Os lipídeos formam um grupo de compostos característicos, que possuem múltiplas funções celulares e ocorrem com frequência na natureza (ZAHA, FERREIRA; PASSAGLIA, 2014). Caracteriza-se como um grupo de compostos solúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Essa característica molecular promove as associações anfipáticas, a mais importante delas é a tendência de os lipídeos formarem micelas e bicamadas, que constituem as membranas biológicas (ZAHA et al., 2014). Como representa a Figura 3.

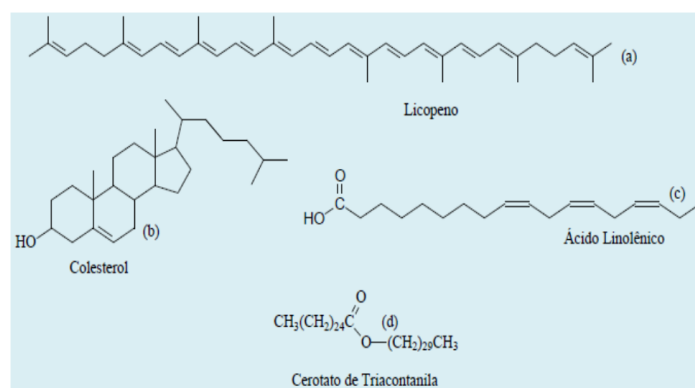
Figura 3. Representação esquemática de uma estrutura de lipídeos, associações anfipáticas de uma micela.



Fonte: <http://lct.nutes.ufrj.br/toxicologia/mII.digs.htm> (2014).

Os lipídeos são substâncias hidrofóbicas, ou seja, insolúveis ou reduzida solubilidade em água que desempenham grande variedade de funções celulares. Eles são compostos principalmente de substâncias não polares (triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos e esteróis) e compostos polares (ácidos graxos livres, fosfolipídios e esfingolipídios) que se ligam covalentemente aos carboidratos e proteínas para formar glicolipídios e lipoproteínas, respectivamente. Os exemplos mais conhecidos de lipídeos são os ácidos graxos e seus derivados: esteróis, ceras e carotenoides (Figura 4). Tem comum a solubilidade em solventes orgânicos: hexano, benzeno, clorofórmio ou metanol. Devido sua natureza apolar apresentando, maior solubilidade em solventes orgânicos, como clorofórmio, metanol, hexano, benzeno (LEHNINGER et al., 2006; NELSON; COX, 2009).

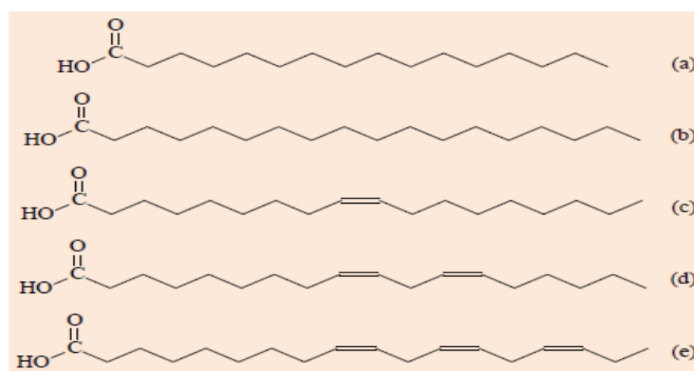
Figura 4. Alguns exemplos de compostos da classe dos lipídeos (a) Carotenoides; (b) Esterol; (c) ácido graxo; (d) cera.



Fonte: RAMALHO; SUAREZ (2013)

Os lipídeos polares são denominados como anfipáticos, por apresentar domínios hidrofóbicos não interagindo com a água e domínios hidrofílica, que interage com a água. São basicamente constituídos por ácidos graxos que correspondem a uma cadeia carbônica apolar e um grupo carboxila polar, sendo representados pela fórmula geral RCOOH, podendo possuir de 4 a 36 átomos de carbonos e nenhuma ramificação. Os ácidos graxos diferem entre si pelo número de carbonos da cadeia e também pelo número de insaturações (figura 5). (CHRISTIE, 1982; MANIRAKIZA, COVACI et al., 2001; NELSON et al., 2002; RAMALHO, SUAREZ, 2013).

Figura 5. Principais ácidos graxos presentes em óleos e gorduras: (i) saturados (a palmítico com 16 carbonos; b, esteárico com 18 carbonos); (ii) insaturados com 18 carbonos (c, oleico com uma ligação dupla; d, linoleico com duas ligações duplas; e, linolênico com 3 ligações duplas)



Fonte: RAMALHO; SUAREZ (2013).

As gorduras e os óleos são as suas principais formas de armazenamento de energia em diversos organismos sob a forma de triglicerídeos, sendo o estado físico a principal diferença entre os dois: as gorduras são sólidas à temperatura ambiente, enquanto os óleos são líquidos (NELSON; COX. 2009).

Assim como outros insumos derivados da biomassa, o uso não comestível de óleos e gorduras sofreu uma forte concorrência durante o Século XX com os derivados do petróleo, tendo permanecido competitivo em um grupo restrito de produtos industriais. No entanto, o crescimento da consciência do grande impacto advindo do uso de derivados de petróleo, além do declínio das reservas internacionais desse bem mineral que provocou uma alta sem precedentes no seu preço, trouxe os óleos e gorduras novamente como matérias primas para indústria no final do Século XX. Assim, conhecer estes insumos e os processos de

transformação nos quais são usados como matéria prima é atualmente de importância estratégica os aspectos químicos dos óleos e gorduras quanto os processos industriais de extração e purificação (RAMALHO, SUAREZ, 2013).

3.4 Bioma Caatinga

O Nordeste do Brasil tem a maior parte de seu território ocupado por uma vegetação xerófila, ou seja, vegetação adaptada a um meio com pouca umidade, com plantas que suportam a escassez de água, possui uma fisionomia e florística variada. O nome Caatinga é de origem tupi-guarani, que tem em seu significado *caa* = mata, *tinga* = branca, relacionado ao fato de que a vegetação, durante a estiagem se apresentam desfolhadas ou secas, e seu aspecto é esbranquiçado (MACHADO, 2013).

É um bioma exclusivamente brasileiro, situado entre os biomas da mata Atlântica e Cerrado, abrangendo uma área de 836.411,23 km² dos quais 81,141 km² situam-se em Pernambuco (GARIGLIO et al., 2010). Fitogeograficamente, a Caatinga ocupa cerca de 11% do território nacional, se estende pela totalidade do estado do Ceará (100%) e mais de metade da Bahia (54%), da Paraíba (92%), de Pernambuco (81%), do Piauí (63%) e do Rio Grande do Norte (95%), quase metade de Alagoas (48%) e Sergipe (49%), além de pequenas porções de Minas Gerais (2%) e do Maranhão (1%) (IBGE, 2010) . Representado na Figura 6.

Figura 6. Mapa do bioma caatinga e seus respectivos estados



Fonte: GAZZETTA (2013)

Segundo DRUMONT et al.,(2000), a altitude da região varia de 0- 600m, e ao se analisar os recursos hídricos, aproximadamente 50% das terras recobertas com a caatinga são de origem sedimentar, ricas em águas subterrâneas. Os rios, em sua maioria, são intermitentes e os volume de água, em geral, é limitado, sendo insuficiente para a irrigação, a precipitação média de 250 a 1000mm e déficit hídrico elevado durante todo o ano, está concentrado num tipo de clima semiárido regional, muito quente e sazonalmente seco. A temperatura do bioma varia de 24 a 28°C, com temperatura média de 26°C, onde vivem micro-organismos com comportamento e adaptações específicas do local.

A Caatinga foi reconhecida como uma das 37 grandes regiões naturais do planeta, conforme estudo coordenado pela Conservação Internacional. Grandes regiões naturais são ecossistemas que abrigam pelo menos 70% de sua cobertura vegetal original preocupam áreas superiores a 100.000 km² e, desta formação considerada estratégicas no contexto das grandes mudanças globais (GIL, 2002).

A quantidade de micro-organismos encontrados tanto no solo, água em plantas e animais da Caatinga é muito variado, entre eles estão bactérias e fungos, cujo muitos deles o cultivo em laboratório não é possível somente no habitat natural. Por exemplo, há espécies de fungos anamorfos, conhecidos como hifomicetos aquáticos tais como, *Thozetella submersa*, *Campylospora ranzoni*, *Dendrosporium lobatum* (CAVALCANTI, MILANEZ, 2007; BARBOSA, GUSMÃO, 2011; FIUZA, GUSMÃO, 2013). Entre os principais micro-organismos presentes no solo da Caatinga, encontra-se em destaque o grupo de Ascomicota e Zigomicota, estudos sobre fungos do solo incluindo um elevado número de espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* (CAVALCANTI, MAIA, 1994; CAVALVANTI et al., 2006; OLIVEIRA, 2008, COSTA et al.2014)

Devido suas características onde há extremos de temperatura, radiação solar intensa e estresse hídrico, propicia a busca de novas substâncias bioativas para diversas aplicações biotecnológicas encontrada em micro-organismos do solo como utilização de sua biomassa para produção de enzima entre outras aplicações. A Caatinga é considerado ainda intocada quanto à biodiversidade microbiana diante da diversidade de ecossistemas do País e do desconhecimento da própria biodiversidade do solo, é possível que muitas espécies sejam extintas antes de

serem conhecidas e por suas características. Porém o bioma é composto por uma grande variedade de espécies animais e vegetais. Da mesma forma, também é observada uma grande diversidade de micro-organismos associados a estes indivíduos e no solo (MERLIN, 2005; EMBRAPA, 2011; COSTA et al., 2014).

3.5 Micro-organismos oleaginosos

Muitos micro-organismos acumulam corpos lipídicos no citosol, incluindo microalgas, protozoários, bactérias, fungos filamentosos e leveduras, sendo micro-organismos utilizados para a produção de lipídeos, considerados oleaginosos, devido à produção de 20% de sua biomassa em lipídeos e podendo chegar à capacidade de acumular até 70% em óleos unicelulares, esses micro-organismos são denominados de oleaginosos e com grande potencial biotecnológico durante o período de estresse metabólico (RATLEDGE, 1996; RATLEDGE, WYNN, 2002; PAPANIKOLAOU, KMAITIS, AGGELIS, 2004; CAZETTA, 2005; PATNAYAK, SREE, 2005; MURPHY et al., 2005; LI ZHAO; BAI, 2007; LIU, ZHAO, 2007; LI et al., 2012; ZHENG, et al., 2012; RAMALHO, SUAREZ, 2013; MORA 2014).

Os fungos compõem o grupo microbiano com maior número de espécies e apresentam imensa variedade quanto à morfologia e quanto aos atributos fisiológicos e bioquímicos (COLEN, 2006; BARBOZA et al., 2010; LIMA et al., 2011; HARWOOD, 2012).

Os óleos microbianos proveniente de fungos, comumente denominados óleos de células simples (SCO), os quais são lipídeos produzidos por micro-organismos oleaginosos, têm sido de interesse potencial para vários pesquisadores nas últimas décadas devido às suas diversas aplicações, propiciando ao homem explorar algumas linhagens fúngicas que apresentam capacidade de produzir produtos e subprodutos com diversas aplicações industriais, como a produção de enzimas, vitaminas, polissacarídeos, poliálcoois, pigmentos, lipídeos e glicolipídeos, como em aditivos alimentares, farmacêuticos, combustíveis e ingredientes de alimentos para a aquicultura. Alguns destes produtos são produzidos comercialmente, enquanto outros são potencialmente valiosos para biotecnologia (RATLEDGE, 1991; RATLEDGE, 2004; SZCZESNA-ANTCZAK, 2006; DEMAIN; ADRIO, 2008; EMBRAPA, 2012, ZEN et al., 2014).

Os lipídeos principalmente os fungos filamentosos têm a vantagem de possuir ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) diferentemente dos óleos de plantas e de animais que possuem além dos insaturados, os ácidos graxos saturados. Suas taxas de crescimento extremamente altas e em uma variedade enorme de substratos permitem a utilização de matérias primas baratas ou mesmo a custo zero na formulação de meios de cultura. Muitos micro-organismos oleaginosos pode acumular lipídeos, especialmente triglicerídios (tags), que são as principais matérias-primas para a produção de biodiesel (WELLBAUM, 2006; LIANG; JIANG, 2013; POLI, 2014).

A produção de óleo pode ser feita ao longo do ano inteiro, pois não há dependência sazonal ou climática, curto ciclo de vida, o potencial enzimático dos micro-organismos permite ainda a produção simultânea de óleos e outros produtos de interesse industrial. A produção industrial de óleos a partir de micro-organismos tem vantagens sobre outras fontes de óleo, pois não necessita de grandes extensões de terra e de enormes quantidades de água e sem preocupações ambientais associados à sua produção (WELLBAUM, 2006; LIANG; JIANG, 2013; POLI, 2014).

Neste sentido são crescentes os estudos que objetivam a obtenção de lipídeos em fungos sob algumas condições de cultivo especial em bioprocessos sólidos ou submersos, com o objetivo de produção de biocompostos aplicáveis em inúmeros setores industriais (LIMA, 2012; RIBEIRO; NOGUEIRA; BURKERT, 2013; LOPES et al., 2014; ZEN et al., 2014).

As leveduras *Rhodospiridium* sp., *Rhodotorula* sp., *Cryptococcus* sp. e *Lipomyces* sp. são exemplos de micro-organismos que podem acumular lipídeos intracelulares com percentuais em torno de 70% de sua biomassa. Esses lipídeos consistem de triacilgliceróis, contendo ácidos graxos, tais como ácido palmítico, esteárico e oleico, ácidos, que são bem adequados para aplicações de biodiesel, sendo uma das fontes de energia renováveis mais promissoras, produzido pela transesterificação de lipídeos- triglicerídeos sugerindo esses micro-organismos oleaginosos como potenciais alternativos para a produção de biocombustíveis (KOSA; RAGAUSKAS, 2011; DEY, BANERJEE; MAIT, 2011).

Comumente os triacilglicerídeos e seus ácidos graxos compreendem uma grande fração dos lipídeos produzidos por fungos. Os ácidos graxos produzidos por fungos oleaginosos podem abranger até 88% da fração lipídica. Destacando entre eles os compostos com dezesseis e dezoito carbonos, que são os mais abundantes. Os ácidos insaturados tais como: oléico e linoléico imperam sobre os ácidos graxos saturados, diferentemente dos óleos de plantas e de animais (MOORE-LANDECKER, 1996; WELLBAUM, 2006; CAMPELO, 2011; LIANG, JIANG, 2013).

Os triacilgliceróis são a forma de estocagem de lipídeos no citoplasma de muitas células, pois, devido a presença da cadeia carbonada, servem como excelente fonte de energia (ZAHA et al., 2014).

A procura por fontes mais eficientes e baratas de processos de produção não tradicional de triglicerídeos, especialmente aquelas que podem ser operados de forma contínua e sem qualquer condição de extensas terras aráveis, é essencial, para uma indústria de biodiesel sustentável. A este respeito, os triglicerídeos microbianos se apresentam como uma matéria-prima alternativa em grande potencial (CASTANHA, 2012; LIANG; JIANG, 2013).

Devido ao fato dos micro-organismos acumularem lipídeos sob condição especiais de cultivo, vem sendo explorados principalmente quanto à produção de alguns lipídeos especiais, como ácido docosahexaenóico (DHA), ácido gama-linolênico (GLA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido araquidônico (ARA) (LI; DU; LIU, 2008; LIANG, JIANG, 2013).

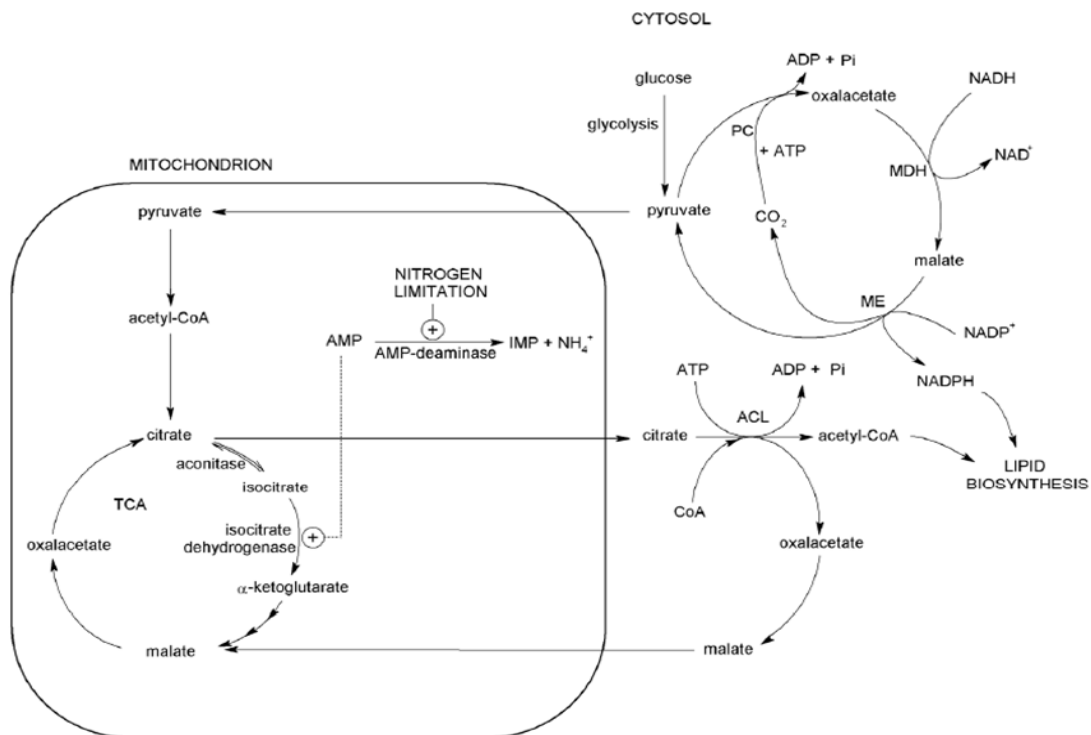
Durante o processo de crescimento microbiano/acúmulo de reservas lipídicas, o fenômeno dominante que define a composição do lipídeo intracelular é, em primeiro passo, o processo específico de incorporação de ácido graxo dentro das células microbianas e, em segundo, as mudanças endocelulares dos ácidos graxos, definida pela capacidade enzimática do micro-organismo (CASTANHA, 2012).

A composição, qualidade e quantidade de lipídeos variam de espécie para espécie de acordo com as condições de cultivo, disponibilidade de nutrientes e com o estágio de crescimento (RATLEDGE, 1996, 2002; MENG et al., 2009 RATLEDGE; WTLKINISON, 1988 apud SILVA, 2011). Alguns micro-organismos

transformam carboidratos e outros nutrientes, utilizando-se da glicose como substrato em lipídeos que se acumulam no interior das células (THAKUR, PRAPULLA; KARANTH, 1989; RATLEDGE, 1996, 2002; LI et al., 2012).

A via bioquímica da biossíntese de lipídeos não é muito diferente entre organismos eucarióticos e não difere em fungos oleaginosos e não oleaginoso. A capacidade de acumular quantidades elevadas de lipídeos depende principalmente na regulação da via biossintética e o fornecimento dos precursores (como por exemplo, acetil-CoA, a malonil-CoA, e glicerol-3-fosfato) e o co-factor NADPH. (KOHLWEIN, 2010; ROSSI et al., 2011) . Representada na Figura 7.

Figura 7. Biossíntese lipídica devido excesso de citrato como uma consequência da limitação de nitrogênio.



Fonte : Adaptado de RATLEDGE (2004).

A formação de lipídeos começa durante a fase exponencial tardia e continua a fase estacionária. O principal fator que determina o acúmulo de lipídeos em micro-organismos é a razão Carbono/ Nitrogênio (C/N), sendo que o excesso de carbono e condições limitantes de nitrogênio favorece o processo, sendo assim a limitação de nitrogênio é a condição mais eficiente para induzir a lipogênese. O micro-organismo

esgota rapidamente a fonte de nitrogênio, mas continua assimilar a fonte de Carbono, levando ao acúmulo de triglicérides. Para que ocorra a síntese de lipídeos é necessário um grande suprimento intracelular de AcetilCoA e de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (MULDER et al., 1962; RASCHKE; KNORR, 2009; ROSSI et al., 2011; POLI, 2014).

A extração de lipídeos de micro-organismos exige a ruptura celular que pode ser realizada através de processos químicos, físicos ou bioquímicos. Um fator determinante que deve ser levado em consideração no processo de extração é a escolha dos solventes. Na maioria dos casos é usada uma mistura de solventes visando maior eficiência de extração (SILVA, 2011). Dentre os métodos de extração de lipídeos utilizados por pesquisadores do mundo inteiro, os mais conhecidos e, geralmente mais efetivos e com melhor rendimento, são os que utilizam a mistura clorofórmio e metanol. Os métodos FOLCH et al., (1957) e BLIGH; DYER (1959) e MANOCHA et al., (1980), são eficazes na extração de lipídeos totais principalmente os polares (MANOCHA et al., 1980; BRUM, 2004).

Com a rápida expansão do biodiesel, óleos microbianos podem se tornar uma das matérias-primas lipídicas com potencial para produção de biodiesel no futuro, embora muitos trabalhos associados com micro-organismos produzindo óleos necessitam ainda serem realizados (LI; DU; LIU, 2008).

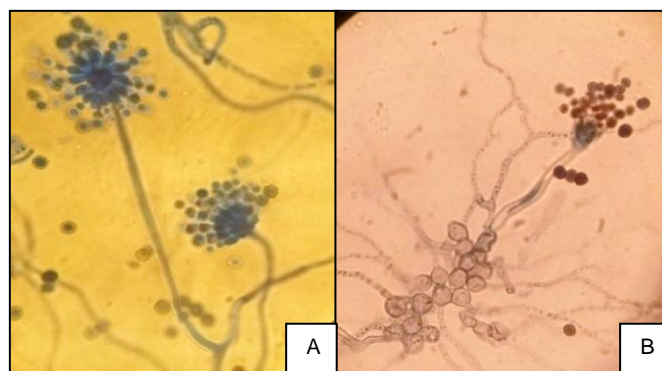
3.6 O gênero *Aspergillus* e aplicação biotecnológica

A classificação do gênero *Aspergillus* tem sido estudada por muitos taxonomistas onde a primeira descrição deste gênero foi feita pelo padre italiano e biólogo Pier Antonio Micheli (1729), que ao observar o fungo ao microscópio, se lembrou da forma de um *Aspergillum* (um borrifador de água benta) e nomeou o gênero de acordo com o objeto (ESPINEL-INGROFF, 2003). Depois desta primeira descrição, muitas espécies foram descritas CHURCH; THOM (1926) foram os primeiros a revisar o gênero *Aspergillus*, aceitando 69 espécies, divididas em 11 grupos, com base em características morfológicas. THOM, RAPER (1945), incluíram 77 espécies no gênero, com 10 variedades em 14 grupos (SILVA, 2009).

O *Aspergillus* é um fungo filamentosso saprófito, mesofílico, que compreende um grupo diversificado, com base em caracteres morfológicos, fisiológicos e filogenéticos, que impactam significativamente a biotecnologia, a produção de alimentos, ambientes internos e à saúde humana. As espécies são encontradas em vários climas em todo o mundo, são fungos capazes de colonizar uma vasta variedade de substratos. São aeróbios e encontrados em quase todos os ambientes ricos em oxigênio, onde geralmente crescem como a superfície de um substrato. Um grupo que possui centena de espécies que torna interessante em diversos estudos (PELCZAR et al.,1981; CHALFOUN; BATISTA, 2003; ANDERSEN et al., 2008; GIONGO et al., 2012; SAMSON et al., 2014; MIDORIKAWA et al., 2014).

O gênero *Aspergillus* representa um grupo de ascomicetos, sub-reino Dikarya, pertencente à ordem Eurotiales, anamorfo , ou seja, caracteriza-se pela produção de esporos assexuais (KLICH; PITT, 1988). As espécies pertencentes a esse gênero tipicamente produzem um conidióforo ereto, além de grande produção de conídios, é asseptado e com base normalmente em forma de “T” ou “L”, comumente chamada de “célula pé”, conectada a uma hifa vegetativa conidióforo estende-se a partir da célula pé e pode continuar a se estender por alguns milímetros de comprimento até chegar à vesícula, na qual as células conidiogênicas métulas e fiálides são formadas. As vesículas podem ter várias formas características (SAMSON et al., 1995; SILVA, 2009; SANTOS, 2013) (Figura 8).

Figura 8. Estruturas reprodutivas assexuada de *Aspergillus parasiticus* e conidióforo, célula conidiogênica (fiálides) e conidiósporos (A). Conidiogênese blástica-fialídica. Conidiósporos *A. flavus* em processo de germinação e produção de conidióforo (B).



A coloração das colônias é a característica principal macroscópica para a diferenciação das seções de *Aspergillus*. Eles possuem vários tons de verde,

amarelo, marrom, branco, preto e cinza. Quando cultivadas em meios artificiais, apresentam crescimento acelerado, inicialmente branco ou amarelo, e posteriormente passam para marrom ou negro (KLICH, 2002).

A primeira classificação realmente útil de anamorfo, Dikaryan, foi criado no final do século XIX, foi com base na morfologia madura. As principais características utilizadas foram: (1) cor, septação e forma de conídios; (2) agregação conidióforo, ou a falta dela; (3) a produção de conídios em estruturas fechadas ou a ausência de tal gabinete consequentemente sendo alvo de estudos para reações, podendo ser estudado em função do acúmulo intracelular de lipídeos (KENDRICK, 2000).

No gênero *Aspergillus* algumas espécies são capazes de se reproduzir de forma sexuada- Emericela. Estes estados teleomórficos ou de reprodução “meiótica” pertencem à família Trichomataceae dos Ascomycota e são caracterizados pela formação de ascos que contêm os ascósporos (KLICH; PITT, 1988; KOZAKIEWICZ, 1989; SAMSON et al., 1995; SAMSON et al., 2014).

Em 2000 estavam descritas 182 espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* (PITT et al., 2000). Segundo Geiser et al. (2007), mais de 40 novas espécies descritas foram publicadas desde 2000, elevando o número total das espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* para aproximadamente 250 espécies. Segundo estes autores, essa classificação tem sido feita com base em características morfológicas, fisiológicas e moleculares, os quais ressaltam, ainda, que o número continuará a crescer à medida que novas espécies forem descobertas e novos conceitos atribuídos (SILVA, 2009).

O *Aspergillus* tem sido objeto de um grande número de estudos taxonômicos usando dados de sequência de DNA. Muitos desses estudos focados em grupos específicos (espécies, seções, subgêneros). Atualmente há uma lista atualizada para o gênero contendo 339 espécies, onde a classificação e identificação de *Aspergillus* tem sido baseada em características fenotípicas e fortemente influenciada pela caracterização molecular e quimiotaxonômica (SAMSON et al., 2014).

As espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*, devido a sua importância econômica, são utilizadas em diversos processos nas indústrias alimentícia, de

bebidas, farmacêutica, na produção de enzimas e são amplamente utilizadas na produção biotecnológica de ácidos orgânicos como o ácido cítrico e o ácido glucônico. O maior impacto econômico positivo do gênero *Aspergillus* tem sido a valorização na produção de enzimas e ácidos por um número de espécies deste gênero. Dois dos mais importantes produtos industriais produzidos por espécies de *Aspergillus* são a amilase fúngica e o ácido cítrico (ABARCA et al., 2004; BAKER, BENNETH, 2008; LIMA et al., 2014; ABREU, 2015).

Através da biotecnologia moderna que é definida como o conjunto de técnicas das ciências biológicas aplicadas à pesquisa e desenvolvimento de produtos voltados ao mercado, através da utilização de recursos biológicos (SILVEIRA; BORGES; BUAINAINS, 2005). O *Aspergillus niger* é reconhecido pela sua capacidade de produção de enzimas, lipase intracelular, possuindo uma média de atividade lipofílica cerca de 5 vezes maior do que outros organismos (SILVA, 2012). Destaca-se como um excelente produtor de metabólitos secundários de interesse industrial e ambiental (MATA-GOMEZ et al., 2009; DHILLON et al., 2012; GOSWAMI et al., 2012; CHAVAN; DESHPANDE, 2013; PATRO et al., 2014; SHIVANNA, VENKATESWARAN, 2014).

Segundo RATLEDGE (1996), as principais classes de micro-organismos utilizados para a produção de lipídeos, considerados micro-organismos oleaginosos, são as leveduras e os fungos filamentosos, estes podem produzir até 40% de sua biomassa em lipídeos e para que um micro-organismo seja candidato favorável aos interesses comerciais, deve apresentar de 20-25% de lipídeos em sua biomassa. Sendo assim, o *Aspergillus*, é uma questão-chave para pesquisa energética atual, que mostra o quanto é importante os membros deste gênero como fonte de energia alternativa (CASTANHA, 2012).

3.7 Utilização de resíduos agroindustriais

A diversidade de resíduos agroindustriais com potencial ambiental e econômico na produção de biomoléculas é crescente, desde meios de processamento de batata, milho (milhocina), o soro de leite, o melaço um subproduto da indústria açucareira, como também resíduo de destilaria, o caju, manipueira entre

outros (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997; DUBEY; JUWARKAR, 2001; RODRIGUES et al., 2006; ROCHA et al., 2007; WHANG et al., 2013, OLIVEIRA et al., 2014; SHEN et al., 2015).

A crescente preocupação com o meio ambiente em relação aos impactos ambientais causado por resíduos vem mobilizando vários segmentos do mercado. Inúmeros órgãos governamentais e indústrias estão se preparando para aplicar uma política ambiental que diminua os impactos negativos à natureza (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007; ARAUJO; RAMOS, 2014; AQUINO et al., 2015). Para isso se busca fontes alternativas para amenizar a problemática ambiental da geração de resíduos industriais e o seu gerenciamento.

Os resíduos em geral, bem como a milhocina, o melaço de cana de açúcar, podem conter muitas substâncias de alto valor e empregando uma tecnologia adequada, este material pode ser convertido em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários. Estes resíduos não sendo bem direcionados, podem apresentar elevados problemas de disposição final e potencial poluente, além de representarem, muitas vezes, perdas de biomassa e de nutrientes de alto valor. Ao contrário do que acontecia no passado, os resíduos eram dispostos em aterros sanitários ou empregados sem tratamento para ração animal ou adubo. Os conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos são cada vez mais difundidos, utilizáveis para a síntese de diversos produtos biotecnológicos considerados úteis (LAUFENBERG et al., 2003; LIMA, 2011; ALVIM, 2015).

Considerando o fato que, para o desenvolvimento ou crescimento de qualquer tipo de micro-organismo é necessário que o substrato preencha as necessidades nutricionais e que seja economicamente viável (CAZETTA; COLABONE, et al., 2005), o emprego de resíduos agroindustriais como a milhocina e o melaço de cana de açúcar, como substratos fermentescíveis, é uma alternativa para minimizar o problema de altos custos para aquisição de bioprodutos de origem microbiana e também colaboram com práticas biotecnológicas mais sustentáveis (ALVIRA et al., 2010; MURUGAN et al., 2011).

3.7.1 *Milhocina*

A milhocina também conhecida por “Corn Steep Liquor” (CSL) ou água de maceração, vem sendo empregada para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos e de grande interesse industrial, é um subproduto que se obtêm através do beneficiamento do milho, uma das culturas mais antigas do mundo, é considerado a terceira cultura mais importante no mundo, não só pelo seu valor nutritivo, mas também economicamente (VASCONCELOS; CARNEIRO, 2010; MACHADO, AMARAL, 2014; FARIAS et al., 2015).

É um subproduto das fases iniciais de moagem do milho pelo processo via úmida, onde o grão de milho é macerado retirando-se o amido, utilizado em cervejarias e diversos outros produtos, dando origem ao efluente com características de uma lama viscosa com cor variando do marrom claro ao escuro (ABIMILHO, 2011; DANIELS, 2013).

O processo que origina a milhocina, ocorre no qual o milho seco é macerado em uma solução de ácido sulfúrico e quente, a maior parte do ácido sulfuroso é absorvido pelos grãos de milho de modo que depois de 10 horas a concentração de ácido sulfuroso na água de maceração é reduzido para 0,01 % e mantida a 45-54°C através do aquecimento da água, uma vez que é recirculado ou utilizando um permutador de calor, a fração solúvel sofre uma suave fermentação láctica natural que ocorre devido à presença de bactérias na solução, sendo então, submetida a uma operação de evaporação, até um teor de 40-60% de sólidos, na qual a milhocina é concentrada e utilizada (LIGGET; KOFFLER, 1948; DOMINGOS, 2009).

O concentrado resultante a água de maceração de milho em bruto, pode ser combinada com glúten e materiais fibrosos para ser vendido como alimentação animal, como alimento complementar na fabricação de ração para aves e na confecção de iscas atrativas para moscas das frutas, além de ser utilizado como suplemento líquido de alimentação para ruminante podendo ser utilizado para outros fins, com ou sem processamento adicional. Na indústria química é utilizada como fonte de nutrientes em processos fermentativos na produção de ácido acético e

ácidos alimentares (LIGGETT; KOFFLER, 1948; WHITE; JOHNSON, 2003; DOMINGOS, 2009; ZANOTTO, 2012; DANIELS, 2013; WANG et al., 2014).

O “CSL” também é usado por a indústria de produtos farmacêuticos na produção de soluções e drogas intravenosas, o mais notavelmente antibióticos, era utilizada para a produção em grande escala da penicilina na década de 1940. Muitos desconhecem, mas a milhocina, “CSL” ou água de milho, também tem sido utilizado na indústria como meio de cultura para a produção da “penicilina”, “estreptomicina” e outras drogas similares. E por apresentar um alto valor protéico é utilizada na composição de tônicos. A dextrose ou açúcar de milho por ser idêntica ao açúcar que existe no sangue humano é usado nos hospitais em injeções endovenosas para recuperar as forças de pessoas enfermas ou em estado pós-operatório. Até mesmo sangue para transfusões é algumas vezes enriquecido com a adição de dextrose. (USDA, 2006; DOMINGOS, 2009; LIMA, 2011; DANIELS, 2013; KHAN, 2014). Uma composição de aminoácidos, vitaminas e minerais é demonstrada na Tabela 2.

Tabela 2. Composição de aminoácidos, vitaminas e minerais encontrados em uma solução concentrada de milhocina.

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

Fonte: Silveira, 2001 (-) Não determinado

Estudos realizados quanto as características físico-química da milhocina correspondem a valores que variam de pH (3,5 a 4,1), possui grande quantidade de

nitrogênio acima de 3,8 a 40,1%, Contendo 40-60% de sólidos . Possui entre 21% a 45% de proteínas, não devendo ser considerada proteína hidrolisada ou hidrolisado protéico e sim como fonte de nitrogênio essencial para o crescimento celular, 20% a 26% de ácido láctico, cerca de 8% de cinzas (contendo Ca^{2+} , Mg^{2+} , k^+ , etc.) cerca de 3% de carboidratos e baixo teor de gordura (0,9% - 1,2%), e outros nutrientes, a qual depende da condição e da qualidade do grão de milho utilizado no processamento. Diversos trabalhos utilizam a milocina apresentando resultados satisfatórios na produção de biomoléculas (CARDINAL; HEDRICK,1948; LIGGET; KOFFLLER,1948; AKTAR et al.,1997; AMARTEY; LEUNG, 2000; PAIVA, 2004; COSTA et al., 2007; FONTES et al., 2008; ANTUNES et al., 2011; YONG-LAN et al., 2013; DANIELS, 2013; KHAN, 2014)

3.7.2 Melaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp) tem uma grande importância social para a economia mundial, por ser responsável pela produção de álcool e açúcar. Foi introduzida no Brasil no início do século XVI e prosperou principalmente na região Nordeste (SANTANA, 2014).

O melaço da cana de açúcar é um subproduto da agroindústria da fabricação de açúcar, extraído da cana-de-açúcar, uma rica fonte de carbono, é um material barato e abundante, frequentemente utilizado como substrato para a produção de etanol (JIMENEZ; BORJA; MARTÍN, 2004; SYDNEY et al., 2014).

Esse sub-produto é constituído geralmente por 48-56% de açúcares totais principalmente a sacarose; 9-12% de matéria orgânica; 2,4% de proteína (Nx6,25);15% a 5% de potássio; 0,4% a 0,8% de cálcio; 0,06% de magnésio;; 0,6 a2,0% de fósforo; 1,0-3,0 mg/kg de biotina;15% a 55% mg/kg de ácido pantotênico; 2500-6000mg/kg de inositol e 1,8 mg/kg de tiamina (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997).

Os carboidratos (glicose, sacarose e frutose), presente no melaço sugerem que ele pode ser uma excelente fonte de carbono (HE et al., 2007). Além disso, no melaço de cana-de-açúcar, encontra-se em sua composição, o nitrogênio, fosfatos, cálcio, magnésio, bem como, zinco, manganês, cobre e ferro (WALISZEWSKI;

ROMERO; PARDIO, 1997), nutrientes importantes para o metabolismo celular, e ainda é considerado um resíduo de fácil manipulação, baixo custo, com grande potencial e muitas aplicações ao nível industrial.

Considerando a importância da fonte de carbono utilizada, bem como, a aplicação de subprodutos agroindustriais, o melaço de cana-de-açúcar tem sido alvo de vários estudos na produção de biomoléculas energéticas (CAZETTA, COLABONE; CELLIGOI, 2005; OLIVEIRA et al., 2014), e devido à presença de grande quantidade de açúcares fermentescíveis em sua composição, ele constitui uma fonte de carbono muito importante para o metabolismo microbiano, um grande exemplo deste aproveitamento, é a utilização dos resíduos como meio de cultura alternativo na produção de biomassa e lipídeos, e como subprodutos em processos industriais.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J. A. S. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. Revista **UNINGÁ Review**. v. 21,n.1, p.55-59. 2015.

ABARCA, M. L. et al. Taxonomy and significance of black *Aspergilli*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, n. 1, p. 33-49, 2004.

ABIMILHO. **Associação Brasileira das Indústrias de Milho**. 2011. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br>>. Acessado em Junho de 2013.

AGENCIA NACIONAL DO PETROLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Biocombustíveis: O que são os biocombustíveis- 2012. Disponível e, <<http://www.anp.gov.br>> Acesso em 10 Jan.2015.

AKHTAR, M. et al. Corn steep liquor lowers the amount of inoculum for biopulping. **Tappi journal**, v. 80, n. 6, p. 161-164, 1997.

ALEXOPOULOS, C. J.; M., C. W.; BLACKWELL, M. Introductory mycology. In: **Introductory mycology**. Ed.4. John Wiley, Sons, 1996.

ALMEIDA, F. I R.G; AZEITEIRO, U. M. Literacia Ambiental no Ensino Secundário—O caso da Escola Secundária Dr. Manuel Candeias Gonçalves. **Revista Captar: Ciência e Ambiente para Todos**, v. 3, n. 2, 2014

ALVES C. T. Transesterificação de Óleos e Gorduras Residuais via rotas metílica e etílica utilizando o catalisador Aluminato de Zinco, em presença ou não de CO₂ supercrítico, 213f.Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Escola Politécnica, 2012.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource technology**, v. 101, n.13, p. 4851-4861, 2010.

ALVIM, J. C. et al. Biorrefinarias: Conceitos, classificação, matérias primas e produtos-Biorefineries: Concepts, classification, raw materials and products. **Journal of Bioenergy and Food Science**.ISSN 2359-2710, v. 1, n. 3, 2015.

AQUINO, A. F. et al. O etanol da cana de açúcar: possibilidades energéticas da região de ceará-mirim-RN. **HOLOS**, v. 1, p. 105-125, 2014.

AMARAL, R. G. Estimativa de custos para implantação do processo de extração de amido de milho. Programa Institucional de Iniciação Tecnológica. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Medianeira. 2010.

AMARTEY, S. A.; LEUNG, J.P.C. Corn steep liquor as a source of nutrients for ethanologic fermentation by *Bacillus stearothermophilus* T-13. **Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia**, v. 19, n. 1, p. 65-71, 2000.

ANDERSEN, M. R; NIELSEN, M. L.; NIELSEN, J.. Metabolic model integration of the bibliome, genome, metabolome and reactome of *Aspergillus niger*. **Molecular Systems Biology**, v. 4, n.1, 2008.

ANP. Agência Nacional de Petróleo, Biocombustíveis e Gás Natural, 2011. <disponível em: < www.anp.gov.br>. Acesso em: 01 Mar. 2014.

ANTUNES, R.; SILVA, C. I. O Papel dos Micro-organismos no Futuro dos Biocombustíveis. **Instituto Nacional da propriedade industrial**, 2011.

ARAÚJO M. F. et al. A produção do Etanol de segunda geração a partir do bagaço da cana-de-açúcar. **Revista Latino-Americana de Inovação e Engenharia de Produção**, v. 2, n. 3, p. 5-16, 2014.

ARAUJO, A. O. ; RAMOS, M. C. P. Limitações dos relatórios de Sustentabilidade para análises custo-benefício de ações sociais e ambientais. **Contextus-Revista Contemporânea de Economia e Gestão**, v. 13, n. 1, p. 132-155, 2015.

BARBOSA, F.R.; GUSMÃO, L.F.P. Conidial fungi from the semi-arid Caatinga biome of Brazil. Rare freshwater hyphomycetes and other new records. **Mycosphere** v.2, p 475-485. 2011.

BARBOZA, D. C.; FARINAS, C.S.; COURI, S. Efeito do método de conservação do fungo *Aspergillus niger* na produtividade enzimática. In: Embrapa Instrumentação- Artigo em anais de congresso (ALICE). In: jornada científica- Embrapa São Carlos, 2009, São Carlos, SP. Anais. Embrapa Pecuária Sudeste: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2009. (Embrapa Pecuária Sudeste. Documentos, 90), 2010.

BAKER, S.E.; BENNETH, J.W.; An overview of the genus *Aspergillus*. In: Godman G.H.;Osmani, S. (editors). *The Aspergilli: Genomics. Medicine, Biotechnology and Research Methods*. Boca Raton, FL: CRC Press. Taylor, Francis, p. 3-13. 2008.

BRAGA, C. F. G. V.; BRAGA, L. V. Desafios da energia no Brasil: panorama regulatório da produção e comercialização do biodiesel. **Cadernos EBAPE. BR**, v. 10, n. 3, p. 751 a 762, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - ANP. Resolução nº 7, de 19 de março de 2008 - DOU 20.3.2008.

BRASIL. Ministério da Integração Nacional. Secretaria de Políticas de Desenvolvimento Regional. Nova delimitação do semiárido brasileiro. Brasília, DF, 2006..

BRUM A. A. S. **Métodos de Extração e Qualidade da Fração Lipídica**. Mestrado em Ciências) Departamento Ciência e Tecnologia de Alimentos. Escola Superior de

Agricultura Luiz de Queiroz Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo, Novembro. 2004.

BUCKLEY, M.; PAREDE, J. Conversão de Energia Microbiológica. Sociedade Americana de Microbiologia, 2006.

CARDINAL, E. V.; HEDRICK, L. R. Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content. **Journal of Biological Chemistry**, v. 172, n. 2, p. 609-612, 1948.

CASTANHA, R. F. Utilização de soro de queijo para produção de lipídeos por leveduras oleaginosas. 2012. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola, Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2012.

CAVALCANTI, M. A.; MAIA, L. C.. Cellulolytic fungi isolated from an alluvial soil in a semi-arid area of the northeast of Brazil. **Revista de microbiologia**, v. 25, n. 4, p. 251-4, 1994.

CAVALCANTI, Q.; M. A. et al. Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região Xingó, Brasil. **Acta botânica brasílica**, v. 20, n. 4, p. 831-837, 2006.

CAVALCANTI M. S.; MILANEZ A. - Hyphomycetes Isolados da Água e do Solo da Reserva Florestal de Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil. *Acta Botanica Brasílica* v.21 n. 4, p 857-862, 2007.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P.C. Aproveitamento do melaço e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 26, n. 2, p. 105-112, 2005.

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

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. Fungos associados a frutos e grãos do café: *Aspergillus* e *Penicillium*. **Embrapa Informação Tecnológica**, 2003.

CHAVAN, S. B.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: An appraisal as a product of commercial potential. **Biotechnology Progress**, v.29, n.4, p. 833-846, 2013.

CHRISTIE, W. W. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesteryl esters. **Journal of Lipid Research**, v. 23, n. 7, p. 1072-1075, 1982.

COLEN G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. Minas Gerais: UFMG. Tese (Doutorado) Programa de pós-graduação em Ciências de Alimentos, Farmácia da UFMG, 2006.

COUTINHO, P.; BOMTEMPO, J. V. Roadmap tecnológico em matérias-primas renováveis: uma base para a construção de políticas e estratégias no Brasil. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 910-916, 2011.

COSTA, M. M. et al. Potencial dos micro-organismos da caatinga: uma abordagem molecular. In: Embrapa Semiárido-Resumo em anais de congresso (ALICE). In: encontro de genética do nordeste, n20.; simpósio de genética humana e médica do nordeste, n2. Campina Grande. Ensino de genética e biologia molecular. Campina Grande: UFPB: Sociedade Brasileira de Genética, 2014.

DANIELS, Ralph S. Corn steep liquor as a biostimulant composition. U.S. Patent n. 8,568,758, 29 out. 2013.

DELATORRE, A. B. Produção de biodiesel: considerações sobre as diferentes matérias-primas e rotas tecnológicas de processos. **Biológicas & Saúde**, v. 1, n. 1, 2011.

DEMAIN, A. L.; ADRIO, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Molecular Biotechnology**, v.38, p.41–55, 2008

DEY, P; BANERJEE, J; MAITI, M K. Comparative lipid profiling of two endophytic fungal isolates– *Colletotrichum* sp. And *Alternaria* sp. having potential utilities as biodiesel feedstock. **Bioresource technology**, v. 102, n. 10, p. 5815-5823, 2011.

DHILLON, G. S. et al. Biotechnological potential of industrial wastes for economical citric acid bioproduction by *Aspergillus niger* through submerged fermentation. **International Journal of Food Science and Technology**, v.47, p.542–548, 2012.

DOMINGOS, M. Estudo do crescimento de *Ceriporiopsis subvermispora* em culturas submersas para a produção de inóculos destinados ao processo de biopolpação. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.2009.

DRUMOND, M. A .et al. Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da caatinga. Seminário para avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga. Anais EMBRAPA/ UFPE e Conservation International do Brasil, Petrolina, 2000.

EMBRAPA MEIO AMBIENTE. 2012. Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br/nova/mostra2.php3?id=770>> Acesso em:< 28 de fevereiro de 2014>.

EMBRAPA- PLANO NACIONAL DE AGROENERGIA/ 2011. Disponível:<www.embrapa.br/publicacoes/institucionais/agroenergia_miolo.pdf> Acesso:< 2013>.

ESPINEL-INGROFF, Ana. Medical Mycology and Training in the United States: A Historical Analysis (1894-1996). **Springer**, 2003.

EEA.Climate for a transport Change Indicators Tracking transport environment in the European Union. 2008.

FAHD, S. et al. Cropping bioenergy and biomaterials in marginal land: The added value of the biorefinery concept. **Energy**, v. 37, n. 1, p. 79-93, 2012.

FARIAS P. O. L., et al. O Cuscuz na alimentação brasileira. Contextos da Alimentação– **Revista de Comportamento, Cultura e Sociedade**, v. 1, n. 3, 2015.

FERNÁNDEZ, J. M. S. Tecnologia de las energias renovables. Madrid: **AMV Ediciones**, 2009.

FINEP- BIOCMBUSTÍVEIS. REVISTA BIOCMBUSTÍVEIS. Inovação em pauta,8 EDIÇÃO.Disponível em:<http://www.finep.gov.br/imprensa/revista/edicao8/inovacao_em_pauta_8_biocombustiveis_0202.pdf>> Acesso em Junho de 2013.

FIUZA, P.O; Gusmão, L.F.P.. Ingoldian fungi from semiarid Caatinga biome of Brazil. The genus *Campylospora*. **Mycosphere** n4:, p 559-565, 2013

FONTES, G. C.; AMARAL, P.F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.

GARAY L.A.; BOUNDY- MILLS K.L. GERMAN J. B.Accumulation of High-Value Lipids in Single-Cell Microorganisms: A Mechanistic Approach and Future Perspectives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.62, n.13, p 2709-2727. 2014.

GARIGLIO, M.A. et al. Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga. Serviço Florestal Brasileiro-SFB, 2010.

GAZZETA- Portal de notícias. Disponível e :<http://www.gazzeta.com.br/especialistas-defendem-rotacao-de-culturas-para-preservar-caatinga/> em 25/04/2013. Acesso em:<15 de junho 2014>.

GIL P.R. Wilderness: Earth's last wild places. CEMEX, S. A. Cidade do México, 2002.

GIONGO, V. et al. Carbono no Sistema Solo-Planta no Semi-árido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia Física**. p.1233-1253, 2012.

GOLDEMBERG, J. Biomassa e energia. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 582-587, 2009.

GOMES, J. A. et al. Prospecção tecnológica do uso de microorganismos na produção de biocombustíveis. Anais do Simpósio Internacional de Inovação Tecnológica-SIMTEC, v. 1, n. 1, 2013.

GOSWAMI, S. et al. A review on production of echinocandins by *Aspergillus* sp. J. **Biochemistry Technology**. v.4, n.1, p. 568-575, 2012.

GRISOLI, R.; COELHO, S. T.; MATAI, P. HLS. Energia microbiológica. **InterfacEHS-Revista de Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 4, n. 2, 2010.

HARWOOD, J. Lipids in plants and microbes. **Springer Science & Business Media**, 2012.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2010. Disponível em:< <http://ibge.gov.br>>. Acesso em Junho de 2013.

JIMÉNEZ, A. M.; BORJA, R.; MARTÍN, A.. A comparative kinetic evaluation of the anaerobic digestion of untreated molasses and molasses previously fermented with *Penicillium decumbens* in batch reactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, n. 2, p. 121-132, 2004.

JESUS, J. G.e R.. Seleção e identificação de cepas bacterianas produtoras de amilases isoladas da microbiota associada a resíduos agrícolas de cacau e dendê. 2014.

KLICH, Ma. A. Identification of common *Aspergillus* species. **Amer Society for Microbiology**, 2002.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. **A laboratory guide to the common Aspergillus species and their teleomorphs**. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, 1988.

KOHLWEIN, SD. Triacylglycerol homeostasis: insights from yeast. **Journal of Biological Chemistry**. n. 285 p.15663–15667. 2010.

KOSA, M.; RAGAUSKAS, A. J. Lipids from heterotrophic microbes: advances in metabolism research. **Trends in biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 53-61, 2011

KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus* species on stored products., 1989.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B; NYSTROEM, M.. Transformation of vegetable waste into value added products:(A) the upgrading concept;(B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 167-198, 2003.

LEFF, E. Saber Ambiental: Sustentabilidade, Racionalidade, Complexidade e Poder. 2001.

LEHNINGER, A.L . **Bioquímica**. 4ª Ed. São Paulo: Sarvier. 2006.

LEITE, R. C. C; LEAL, M. R.L.V; O Biocombustível no Brasil. **Novos Estudos - CEBRAP** n 78, p.15-21, 2007.

LI, S. L. et al. Biodiversity of the oleaginous microorganisms in Tibetan Plateau. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 627-634, 2012.

LIU, Y.; ZHAO, Z. K.; BAI, F. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 3, p. 312-317, 2007.

LI, Q., DU, W., LIU D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**. V. 80, n. 5, p. 749-756, 2008. ISSN 0175-7598.

LIANG M.H; JIANG J.G. Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. **Progress in Lipid Research**, v. 52, p. 395-408, 2013.

LIGGETT, R. W.; KOFFLER, H. Corn steep liquor in microbiology. **Bacteriological reviews**, v. 12, n. 4, p. 297, 1948.

LIMA, J. M.N . Produção do complexo quitosana- polifosfato em *Rhizopus oryzae* ucp 1506 utilizando substratos agroindustriais. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Desenvolvimento de Processos Ambientais, Departamento de Biotecnologia e Meio Ambiente. Universidade Católica de Pernambuco, Pernambuco, 2011.

LIMA, P.C.R. O biodiesel e a inclusão social. Consultoria Legislativa. Brasília: Câmara dos Deputados, 2004.

LIMA, B. M. Produção de biossurfactantes pelos fungos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum* em fermentação semi-sólida utilizando resíduos agroindustriais como substrato. 2012. 75 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2012

LIMA, B. F et al. Seleção de meios de produção de Lipase por amostras de *Aspergillus* sp isoladas da Caatinga de Pernambuco. **E-Xacta**, v. 7, n. 1, 2014.

LOPES, D. C. et al. Cultivo de microalgas para a produção de biodiesel: potencial a ser explorado. **Revista Eletrônica de Energia**, v. 4, n. 1, 2014.

KHAN I. et al. Calcium malate overproduction by *Penicillium viticola* 152 using the medium containing corn steep liquor. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.98, n.4, p.1539-1546. 2014.

YONG-LAN X. et al., Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* NJ113 using corn steep liquor powder as nitrogen source. *Bioresource Technology*. 136, 775–779.2013.

MACHADO, A. M. C. Potencial das biomassas disponíveis no nordeste brasileiro como fontes alternativas de geração de energia.111f. Dissertação (Mestre em Desenvolvimento e Meio Ambiente) Universidade Federal de Sergipe, 2010.

MACHADO, C.G. A Caatinga e suas aves. **ComCiência**, n. 149, p. 0-0, 2013.

MACHADO, C.C.; AMARAL, M. B. Um pé de cultura e de milho, angico, mangaba e baobá. **Textura-ulbra**, v. 16, n. 30, 2014.

MAKKAR, R.; CAMEOTRA, S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 4, p. 428-434, 2002.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. **Journal of food composition and analysis**, v. 14, n. 1, p. 93-100, 2001.

MANOCHA, M. S.; SAN-BLAS, G.; CENTENO, Sonia. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. **Journal of General Microbiology**, v. 117, n. 1, p. 147-154, 1980.

MARQUES, S.. Energias fósseis versus energias renováveis: proposta de intervenção de educação ambiental no 1.º ciclo do ensino básico. 2007.

MATA-GOMEZ, M. et al. A Novel tannase from the xerophilic fungus *Aspergillus niger* GH1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, n.9, p.987-996, 2009.

MENDONÇA, R. M. L. Avaliação de ciclo de vida do carbono na queima de biodiesel à base de óleo de soja. 2007. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Mecânicas)- Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

MENG, X. et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable energy**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 2009.

MENDES, R. K. et al. Desenvolvimento de um Biossensor Eletroquímico Obtido com Extrato Vegetal para a Determinação de Triglicerídeos em Biodiesel. **Revista Virtual de Química**, 2014.

MIDORIKAWA, G. E.O. et al. Characterization of *Aspergillus* species on Brazil nut from the Brazilian Amazonian region and development of a PCR assay for identification at the genus level. **BMC microbiology**, v. 14, n. 1, p. 138, 2014.

MORA, L.S.P. Avaliação do crescimento de *Botryococcus braunii* em reator tubular empregando diferentes concentrações de fontes de nitrogênio e fósforo. 2014 74f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2014.

MOORE-LANDECKER, E. et al. Fundamentals of the fungi. **Fundamentals of the fungi**, n. Ed. 4, 1996.

MOREIRA, R. M. et al. Prospecção de isolados fúngicos oleaginosos provenientes de resíduos agroindustriais do cerrado para geração de biocombustíveis. **Científic@**, n. 1, p. 01 a 08, 2014.

MUNIRAJ, I. K. et al. Utilization of potato processing wastewater for microbial lipids and γ -linolenic acid production by oleaginous fungi. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2015.

MURUGAN, S. et al. Production of Xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 6915 using saw dust as substrate under solid state fermentation. **Enzyme research**, v. 2011, 2011.

MURPHY, D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progress in Lipid Research** n.40 v.5 p. 325-438, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 4a edição. São Paulo: Sarvier, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M.M. LEHNINGER princípios de bioquímica. Omega, 2009.

NELSON, D.L.; COX, M.M.; LEHNINGER: Princípios da Bioquímica. 3ª Ed. São Paulo. 2002.

OCTAVIANO, C. Mudança de petróleo para biomassa impulsiona a química verde. **ComCiência**, n. 130, p. 0-0, 2011.

OLIVEIRA S. D; et al Emprego de fungos filamentosos na biorremediação de solos contaminados por petróleo: estado da arte. **Cetem**, 2008.

OLIVEIRA, A. R. et al. Produção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus*, em fermentação contínua, utilizando melaço de cana-de-açúcar previamente tratado com invertase. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 2, n. 1, 2014.

OLIVEIRA et al. Produção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus*, em fermentação contínua, utilizando melaço de cana-de-açúcar previamente tratado com invertase. UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde, v. 2, n. 1, 2014.

PAPANIKOLAOU, S.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 3, p. 287-291, 2004.

PATNAYAK, S.; SREE, A. Screening of bacterial associates of marine sponges for single cell oil and PUFA. **Letters in applied microbiology**, v. 40, n. 5, p. 358-363, 2005.

PATRO, K. R. et al. Development of new medium composition for end production of L-asparaginase by *Aspergillus* f. **Journal of Environmental Biology**,v.35, p.295-300, 2014.

PELÁ, A.L. B. Etanol de segunda geração a partir do bagaço de cana-de-açúcar: análise do ciclo de vida com relação às emissões de CO₂ . 2014. 33f. Monografia (Curso de Engenharia Bioquímica) Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2014.

PELCZAR, M. J.; REID, R. D.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. McGraw-Hill, 1981.

PELIZER, L. H; PONTIERI, M. H; OLIVEIRA MORAES, I. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 2, n. 1, p. 118-127, 2007.

PEREIRA, C. M. et al. Biodiesel derived from microalgae: advances and perspectives. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2013-2018, 2012.

PEREIRA, V. C. et al. O debate acerca das insuficiências da modernização ecológica para pensar a sustentabilidade ambiental na agricultura em tempos de mudanças climáticas. *Observatorio de la Economía Latinoamericana*, n. 199, 2014.

PIVOTTO, F.; FERREIRA, M. L.; FERREIRA, A. P. N. L. Análise do ciclo de vida do biodiesel no mercado brasileiro e quantificação das emissões liberadas pelo uso desse combustível. **E-xacta**, v. 9, n. 3, p. 293-300, 2011.

PITT J. I. et al. List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. In: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification (Samson RA, Pitt JI, eds). **Harwood Academic Publishers, Amsterdam**, p. 9-79 2000.

POLI, J. S. Otimização da produção e caracterização do óleo microbiano produzido pela levedura *Yarrowia lipolytica* QU21. 2014 105 f. Tese (Doutorado) Programa de pós graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. 2014.

PRETO, N. A. E. Avaliação da influência de antioxidantes na estabilização de Biodiesel. 2012. 58f. Dissertação (Mestrado). Ramo Otimização energética na indústria química. Instituto Superior de Engenharia do Porto.2012.

PRIBERAM. Dicionário Priberam da Língua Portuguesa. **Priberam Informática S. A.**, 2013. Disponível em: <<http://www.priberam.pt/dlpo/biomassa>>. Acesso em: 01 Abril 2014.

RAFAEL, S. I. A Conversão Energética de Biomassa Florestal e a Qualidade do Ar. 2012. 138 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Ambiente, Departamento de Ambiente e Ordenamento, Universidade de Aveiro,

RAMALHO H; F.; SUAREZ, P.A. Z. A Química dos Óleos e Gorduras e seus Processos de Extração e Refino. **Revista Virtual de Química**.V. 5, N.1.p 2-15, 2013.

RAMOS, L. P. et al. Tecnologias de produção de biodiesel. **Revista virtual de química**, v. 3, n. 5, p. 385-405, 2011.

RATLEDGE, C. Microorganisms for lipids, **Acta Biotechnologica**, v. 11, n. 5, p. 429– 438, 1991.

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

RATLEDGE, C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, n. 6, p. 1047-1049, 2002.

RATLEDGE, C.. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 807-815, 2004.

RASCHKE D.; KNORR D. Rapid monitoring of cell size, vitality and lipid droplet development in oleaginous yeast *Waltomyces lipofer*. **Journal of Microbiological Methods** v.79, p.178-183. 2009.

RIBEIRO, N. T.; NOGUEIRA, D. Al.; BURKERT, C. A. V. Produção de Lipídios por *Phaeodactylum tricornutum* Utilizando Glicerina como Fonte de Carbono. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3esp, p. 46-49, 2013.

ROSSI, M., AMARETTI, A., RAIMOND, S., LEONARD, A. Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi, Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies. Ed. Dr. MargaritaStoytcheva. ISBN: 978-953-307-713-0. 2011.

RODRIGUES, E. F. et al. Produção de compostos com propriedades emulsificantes por *Aspergillus flavus* utilizando resíduos agroindustriais. **RECEN-Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 16, n. 1, 2014.

SAMSON, J.C., W., C.L., MENK, F.W. ;FRASER, B.J. Fine a structure in the spectra of low latitude field line resonances. **Geophysical Research Letters** 22: doi: 10.1029/95GL01770. ISSN: 0094-8276.1995.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in mycology**, v. 78, p. 141-173, 2014.

SANTANA, A.L. Cana-de-açúcar. Disponível em: <
<http://www.infoescola.com/plantas/cana-de-acucar/>> Acesso em : 15 Jan. 2015.

SANTOS, V. E. N. Proposta metodológica para criação de biorrefinaria de bagaço de cana produtora de bioplataformas químicas: um ensaio preliminar como parte de um de sistema de simbiose industrial em Campos dos Goytacazes-RJ. 2013. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

SANTOS, M. M. H. et al. Isolamento e Caracterização de Bactérias Endofíticas de Cana-de-açúcar Raras e Comuns Com Ênfase na Fixação Biológica do Nitrogênio. In: Embrapa Tabuleiros Costeiros-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: seminário de iniciação científica e pós-graduação da embrapa tabuleiros costeiros,v. 4. 2014, Aracaju. Anais. Brasília. 2014.

SEBRAE. *Uso de resíduos e dejetos como fonte de energia renovável*. Brasília. SEBRAE – Serviço de Apoio as Micro e Pequenas Empresas. 2009.

SYDNEY, E. B., Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source. **Bioresource Technology**. v.159. p.380-386. 2014.

SILVA, D. M.. Identificação de espécies de *Aspergillus* seção *nigri* por taxonomia polifásica e descrição de duas novas espécies do gênero. 2009. 76f. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras- UFLA, Minas Gerais, 2009.

SILVA G.K.B. Produção de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) por *Cunninghamella elegans* UCP 542 em substratos alternativos. 2011. 99f. Dissertação (mestrado). Curso de Ciências Biológicas. Departamento de pós graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco- PE, Recife, 2011.

SILVA K. P. Produção de lipídios por microrganismos através de fermentação em estado sólido. XXII Mostra de Iniciação Científica. Ecossustentabilidade. UPF.2012

SILVA G.S. P. Concentração de amido e estimativa de rendimento de álcool em batata-doce cultivada com diferentes fontes e doses de potássio, Dissertação (Mestrado) 66 f. Bioenergia, área de concentração em Biocombustíveis Universidade Estadual do Centro-Oeste 2013.

SILVA, D. F. et al. Seleção de micro-organismos celulolíticos, comparados com o *Trichoderma reesei* CCT2768. BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports, v. 2, n. 3 esp, p. 281-284, 2013.

SILVA, S. S; IZABEL, T. S.S.; GUSMÃO, L. F. P. Conidial fungi associated with submerged plant debris in some areas of Caatinga biome. **Rodriguésia**, v. 65, n. 2, p. 527-538, 2014.

SILVEIRA, J. M. F. J.; BORGES, I. C.; BUAINAIN, A. M. Biotecnologia e agricultura: da ciência e tecnologia aos impactos da inovação. **São Paulo em Perspectiva**., São Paulo, v. 19, n. 2, 2005.

SILVEIRA, M. et al. Production of glucose–fructose oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 55, n. 4, p. 442-445, 2001.

SOUZA, V. F. Análise da cadeia produtiva do etanol e do biodiesel. 2014.

SHIVANNA, G. B.; VENKATESWARAN, G. Phytase Production by *Aspergillus niger* CFR 335 and *Aspergillus ficuum* SGA 01 through Submerged and Solid-State Fermentation. **The Scientific World Journal**, ID 392615, p. 1-6, 2014.

SHEN, N. et al. Production of succinic acid from sugarcane molasses supplemented with a mixture of corn steep liquor powder and peanut meal as nitrogen sources by *Actinobacillus succinogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, 2015.

SPECIAN V. et al., Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **Revista Científica Ciências Biológicas Saúde** v.16 n.4 p. 345-51, 2014.

SZCZESNA-ANTCZAK, M. et al. Relationships between lipases and lipids in mycelia of two *Mucor* strains. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 6, p. 1214–1222, 2006.

THAKUR, M. S.; PRAPULLA, S. G.; KARANTH, N. G. Estimation of intracellular lipids by the measurement of absorbance of yeast cells stained with Sudan Black B. **Enzyme and microbial technology**, v. 11, n. 4, p. 252-254, 1989.

TSURKAN, Y. et al. Identification of newly-isolated microorganisms containing valuable polyunsaturated fatty acids. **Journal of Biotech Research** ISSN: 1944 - 3285, v. 6, p. 14-20, 2015.

UNICA- União da Indústria de cana de açúcar, São Paulo, 2013

USDA. 2006. The Rescue of Penicillin. United States Department of Agriculture. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/is/timeline/penicillin.htm>> < Acesso em: 08 de maio de 2014.

VASCONCELOS, V. D. B.; CARNEIRO, N. P. Transformação genética de milho com construções gênicas contendo o gene AtDREB2A visando tolerância à seca. Biblioteca Embrapa Milho e Sorgo – Sete Lagoas, Minas Gerais, 2010. Disponível em <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/855255/1/Transformacaoogenetica.pdf>>. Acesso em 01 de fevereiro de 2015.

WALISZEWSKI, K. N.; ROMERO, A.; PARDIO, V. T. Use of cane condensed molasses solubles in feeding broilers. **Animal feed science and technology**, v. 67, n. 2, p. 253-258, 1997.

WELLBAUM, CHRISTIAN. Produção de ácidos graxos por linhagens de *mucor* spp. Isoladas de solo de área de Cerrado município de Corumbataí **unesp**. 2006. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.

WHITE, P.; JOHNSON, L.A. Corn: Chemistry and Technology ed.2 **American Association of Cereal Chemists**. 2003.

WANG, Y. et al. Engineering and adaptive evolution of *Escherichia coli* W for L-lactic acid fermentation from molasses and corn steep liquor without additional nutrients. **Bioresource technology**, v. 148, p. 394-400, 2013.

WYNN, J. P.; RATLEDGE, C. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. **Advances in applied microbiology**, v. 51, p. 1-51, 2002.

ZANOTTO, C., Caracterização de resíduo da indústria de beneficiamento de milho. 37f. Dissertação (Bacharel em Química) - Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná 2012.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.r; PASSAGLIA, L. MP. Biologia Molecular Básica-5. Artmed Editora, 2014.

ZEN, C. K. et al. INDUÇÃO DA SÍNTESE DE LIPÍDIOS E PROTEÍNAS POR *Aspergillus niger*. **Revista CIATEC-UPF**, v. 6, n. 2, p. 40-47, 2014.

ZHENG Y. et al. Feasibility of filamentous fungi for biofuel production using hydrolysate from dilute sulfuric acid pretreatment of wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, p. 5- 50, 2012.

ZUNIGA, A. D. G. et al. . Situação atual e perspectivas do biodiesel no estado do Tocantins. Desafios: **Revista Interdisciplinar da Universidade**. Fed. Tocantins, v.1, n.1 , p. 263-278. 2015.

CAPÍTULO II

Manuscrito a ser submetido para publicação na Revista
E-xa



ISSN: 1984-3151

SELEÇÃO DE AMOSTRAS DE ASPERGILLUS SPP. PARA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS INTRACELULARES COM APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

SAMPLES SELECTION ASPERGILLUS SPP. LIPIDS FOR INTRACELLULAR PRODUCTION WITH BIOTECHNOLOGY APPLICATION

Nairane da Silva Rosa Leão¹; Roberta Leite Santos Reis²

Grayce Kelli Barbosa da Silva³; Jaceline Maria de Negreiros Lima⁴; Ricardo Kenji Shiosaki⁵
Kaoru Okada⁶.

- 1 Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE. nairane.rs@gmail.com.
- 2 Mestrado em Desenvolvimento em Processos Ambientais- Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE robertalsreis@yahoo.com.br.
- 3 Doutorado em Ciências Biológicas-Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE grayce_kelli@yahoo.com.br
- 4 Doutorado em Ciências Biológicas. -Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE jaceline_maria@yahoo.com.br
- 5 Doutor em Ciências Biológicas. Universidade Pernambuco- Rodovia BR 203, Km 2 - Vila Eduardo, Petrolina - PE, 56328-903. kenjishiosaki@gmail.com
- 6 Doutora em Medicina. Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco. Recife, PE. kao@unicap.br

Recebido em: XX/XX/XXXX - Aprovado em: XX/XX/XXXX - Disponibilizado em: XX/XX/XXXX

RESUMO: Os lipídeos são substâncias hidrofóbicas e importantes componentes de fungos tanto em termos de estrutura e constituição da membrana. Tem sido de interesse, pois apresentam capacidade de produzir produtos e subprodutos com aplicações industriais e biotecnológicas para diversos fins, sejam eles na aplicação em aditivos alimentares, farmacêuticos e combustíveis como o biodiesel, pois principalmente devido ao modelo econômico baseado na utilização de fontes energéticas de origem fóssil há necessidade de selecionar fontes naturais renováveis e menos poluentes para sua produção. Foram realizadas estudo para seleção de 10 amostras de *Aspergillus* isoladas do semiárido de Pernambuco, para produção de lipídeos em meio Czapek líquido. As fermentações submersas ocorreram a 28°C, sob agitação orbital de 150 rpm, por 96h. Os resultados obtidos indicaram que a amostra *Aspergillus parasiticus* UCP 1182, apresentou 44,2% de lipídeos totais utilizando a metodologia descrita por FOLCH modificada por MANOCHA, enquanto pelo método de FOLCH modificada por BLIGH e DYER o *A. parasiticus* apresentou 27,5% de lipídeos totais. Demonstrando potencial em acumular lipídeos intracelulares com percentual acima de 20% de sua biomassa em ambas as metodologias, configurando-o desta forma como micro-organismo

oleaginoso, com potencial alternativo para produção de biocombustíveis e para a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado.

PALAVRAS-CHAVE: *Aspergillus parasiticus, micro-organismo oleaginoso, lipídeos, semiárido, biocombustível*

ABSTRACT: *The hydrophobic substances and lipids are major components of fungi both in terms of structure and constitution of the membrane. It has been of interest, since they have ability to produce products and by-products for industrial and biotechnological applications for various purposes, whether the application in food, pharmaceutical and fuel additives such as biodiesel, because mainly due to the economic model based on the use of energy sources fossil is no need to select renewable natural sources and cleaner for their production. Studies were conducted for selection of 10 samples of *Aspergillus* isolated from the soil of the Caatinga of Pernambuco for the production of lipids in the media Czapek. Submerged fermentation carried on at 28°C under orbital shaker of 150 rpm for 96 hours. The results indicated that the sample *Aspergillus parasiticus* (sample 9), showed 44.2% of total lipid using the method FOLCH modified by Manocha, while the method Folch modified by BLIGH & Dyer, the *Aspergillus parasiticus* (sample 9), showed 27.5% of total lipids. Demonstrating potential to accumulate intracellular lipids with a percentage above 20% of their biomass considered oleaginous microorganisms with potential alternative for biofuel production and to obtain value-added bioproducts.*

KEYWORDS: *Aspergillus parasiticus, oleaginous microorganism, lipids, semiarid, biofuel*

1 INTRODUÇÃO

Muitos micro-organismos como bactérias, algas, leveduras, acumulam corpos lipídicos no citosol, entre eles encontramos os fungos filamentosos utilizados para a produção de lipídeos, considerados oleaginosos, devido à produção de 20% de sua biomassa em lipídeos e podendo chegar à capacidade de acumular até 70% durante o período de estresse metabólico (RATLEDGE, 1996; MURPHY, 2001; LIU & ZHAO, 2007; ZHENG, et al., 2012 TANIMURA et al., 2014).

O acúmulo e a composição de lipídeos são influenciados pela constituição genética e por fatores como condições de cultura (temperatura, pH, tempo, entre outros) e composição do meio, onde o fungo foi submetido (MENG, XIN et al., 2009).

A formação de lipídeos começa durante a fase exponencial tardia e continua a fase estacionária. O principal fator que determina o acúmulo de lipídeos em micro-organismos é a razão Carbono/ Nitrogênio (C/N), sendo que o excesso de carbono e condições limitantes de nitrogênio favorece o processo, sendo assim a limitação de nitrogênio é a condição mais

eficiente para induzir a lipogênese (RASCHKE; KNORR, 2009; ROSSI et al., 2011; POLI, 2014).

Assim sendo, a produção industrial de óleo a partir de micro-organismos em relação a outras fontes oleaginosas mais vantajosa, por apresentar sobre tudo a não necessidade de grandes extensões de terras agriculturáveis, o uso de enormes quantidades de água, evita a poluição do solo e o desmatamento reservas ambientais, pois estes são os principais fatores que afetam a agricultura (CERTIK 2006; RATLEDGE, 2004).

Os lipídeos são substâncias hidrofóbicas, ou seja, insolúveis ou reduzida solubilidade em água, devido a sua natureza apolar apresentando, no entanto, maior solubilidade em solventes orgânicos, como clorofórmio, metanol, hexano, benzeno. Os lipídeos polares são denominados como anfipáticos, por apresentar domínios hidrofóbicos não interagindo com a água e domínios hidrofílica, que interage com a água (NELSON et al., 2002; LEHNINGER et al., 2006; RAMALHO; SUAREZ, 2013; ZAHA et al., 2014).

O *Aspergillus* compreende um grupo diversificado que destacam como excelentes produtores de metabólitos secundários de interesse industrial e ambiental, reconhecido pela sua capacidade de produção de

enzimas, lipase intracelular, possuindo uma média de atividade lipofílica cerca de 5 vezes maior do que outros organismos, o que favorece estudos de seleção e produção de bioprodutos de alto valor agregado (MATA-GOMEZ *et al.*, 2009; DHILLON *et al.*, 2012; SILVA, 2012. PATRO *et al.*, 2014; ABREU 2015).

Este trabalho teve por objetivo selecionar amostras de *Aspergillus* spp. isoladas da Caatinga de Pernambuco, para produção de lipídeos intracelulares com aplicação biotecnológica por fermentação submersa em com duas metodologias de extração de lipídeos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO

As amostras do gênero *Aspergillus*, com as espécies de *A. niger*, *A. flavus* e *A. parasiticus*, foram isoladas do solo do semiárido do Estado de Pernambuco e depositadas no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), da Universidade Católica de Pernambuco. A linhagem foi mantida em meio de cultivo ágar Sabouraud (SAB) peptona de carne (10g/L), glicose (40g/L) ágar (15g/L) à 30°C.

2.2 MÉTODOS

Condições de Cultivo: As amostras de *Aspergillus* foram crescidas em Batata Dextrose e Ágar (BDA) por 96h, onde os esporos foram coletados com o uso de swabs, transferidos para água destilada estéril em frascos de penicilina e determinado o número de 10^7 esporos/ml na câmara de Neubauer. Alíquotas de 5 ml da suspensão de esporos, foram transferidas para o meio de produção .

Microcultivo: Para a técnica utilizou-se a metodologia de RIDELL (1950). As placas de Petri foram forradas com o papel-filtro, sobre o qual foi colocado o suporte, uma lâmina e uma lamínula. Em seguida foi esterilizado na autoclave por 121° C por 30 minutos.

Para a montagem do microcultivo foi cortado um pequeno pedaço em formato de bloco de gelose do meio BDA, e inoculou-se o micro-organismo nos lados e em cima do bloco de gelose e colocou-se uma lamínula umedecendo o papel filtro com água destilada esterilizada. O microcultivo foi incubado a temperatura ambiente e acompanhado diariamente o desenvolvimento das micro estruturas.

Meio de produção: A biomassa foram inicialmente produzidos no meio sintético Czapek líquido, com a seguinte composição: sacarose (30 g/L), nitrato de sódio (3g/L), fosfato de potássio (1g/L), sulfato de magnésio (0,5g), cloreto de potássio (0,5 g/L), sulfeto ferroso (0,01g/L), extrato de levedura (3g/L), extrato de malte (3g/L) e peptona de carne (3g/L).

Processo fermentativo: Foram utilizados frascos de Erlenmeyers com 100 mL de meio. Foram inoculados 5% da suspensão de esporos contendo 10^7 esporos/ml, mantidos sob agitação orbital de 150 rpm, a temperatura de 28°C, por um período de 96h para obtenção da biomassa.

Quantificação da Biomassa: para a determinação da biomassa microbiana, foi utilizado método direto, amostra filtrada e encaminhada liofilização, verificado o volume do peso seco com pesagem utilizando a balança analítica.

Análise qualitativa de lipídeos por coloração

Sudan Black: Para análise da acumulação de lipídeos no micélio de *Aspergillus* amostras obtidas durante a filtração, correspondentes a 5 dias de cultivo, foram submetidas a coloração Sudan Black (SHEEHAM, STOREY, 1947) as amostras (pellets) foram lavadas com Solução salina tamponada de fosfatos (PBS) e fixado com paraformaldeído (PFA) por 1 hora e lavado com a solução PBS. Os “pellets” foram incubados em Sudan Black (0,3% em etanol a 70%) por 10 minutos no (escuro) em temperatura ambiente ($\pm 30^\circ\text{C}$). O excesso de corante foi lavado com etanol 70% e com água destilada esterilizada. Finalmente foram contra-

coradas com safranina (solução aquosa a 0,5%) safranina por 30 segundos. Os micélios foram lavadas sucessivas vezes ($\pm 20x$) com solução tampão.. Os micélios foram colocados em lâminas cobertas por glicerina tamponada observadas em estereoscópio para melhor separação das hifas e lamínula. Posteriormente foram observadas em microscópio modelo Nikon Microscópio Alphapht 2 Y52, e fotografadas com câmera Nikon FDX-35 para verificação de corpos lipofílicos intracelulares

Extração dos lipídeos totais: Os lipídeos foram extraídos utilizando primeiramente a metodologia FOLCH et al., (1957) adaptada por BLIGH, DYER (1959). Em um Erlenmeyer de 250mL contendo 1g de amostra, 20mL de Metanol (MeOH) e 10mL de clorofórmio ($CHCl_3$) foram adicionados e a mistura foi agitada durante 2 minutos. Foi adicionada uma segunda vez 10mL de $CHCl_3$ e agitada vigorosamente a mistura por 2 minutos. Foram adicionados 18mL de água destilada e novamente agitadas por 2 minutos. As camadas foram separadas por centrifugação durante 10 minutos a 2000 rpm. A camada inferior foi feita com 20mL de 10%(v/v) de MeOH em $CHCl_3$ em agitação durante 2 minutos. Após centrifugação a fase de $CHCl_3$ foi adicionado ao primeiro extrato. Os extratos foram reunidos e evaporados até a secura no rotoevaporador. Em seguida 1 a 2mL de hexano, foi utilizado para recuperar os lipídeos, que depois foram evaporados sob atmosfera de nitrogênio e mantidos no dessecador até peso constante.

Em um segundo momento foi realizada a extração dos lipídeos totais pela metodologia descrita por FOLCH et al. (1957) adaptado por MANOCHA et al., (1980). Onde 1,0 g da biomassa liofilizada foram submetidas à extração sucessivas de lipídeos por três vezes, usando clorofórmio: metanol (2:1; 1:1; 1:2 v/v). O material foi agitado por 15 minutos, posteriormente homogeneizado por 24 horas, após cada troca de solvente. Durante os intervalos da extração o sobrenadante foi separado da biomassa por

centrifugação a 5000g, por 10 minutos e a biomassa submetida a uma nova extração. Os extratos foram reunidos e evaporados até a secura no rotoevaporador. Em seguida 1 a 2 mL de hexano, foi utilizado para recuperar os lipídeos, que depois foram evaporados sob atmosfera de nitrogênio e mantidos no dessecador até peso constante.

Quantificação dos lipídeos totais: A quantificação dos lipídeos presentes da biomassa foi determinada por método gravimétrico. As respostas para a produção de lipídeos foram calculadas em termos de concentração de lipídeos ($g L^{-1}$) e ou lipídeos totais (%) equação 1.

(eq.1)

$$\text{Lipídeos Totais (\%)} = \frac{\text{massa de lipídeos (g)} \times 100}{\text{biomassa seca (g)}}$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 MICRO-ORGANISMOS

Foram realizados seleção de amostras de *Aspergillus* spp, isoladas do solo da Caatinga de Pernambuco mantido no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisa de Ciências Ambientais e Biotecnologia- Universidade Católica de Pernambuco (UCP). Conforme Tabela 1.

Tabela 1. Relação de biomassa das amostras de *Aspergillus*, em meio produção Czapek líquido.

UCP	Micro-organismos	Biomassa (g/ 100 mL)
1183	<i>Aspergillus niger</i>	1,28
1181	<i>Aspergillus niger</i>	1,19
1177	<i>Aspergillus niger</i>	0,78
1179	<i>Aspergillus flavus</i>	2,05
1185	<i>Aspergillus flavus</i>	2,42
1186	<i>Aspergillus flavus</i>	2,56
1184	<i>Aspergillus parasiticus</i>	2,23
1178	<i>Aspergillus parasiticus</i>	1,58
1182	<i>Aspergillus parasiticus</i>	2,03
1180	<i>Aspergillus parasiticus</i>	1,26

Os resultados obtidos após a seleção realizado em fermentação submersa foi evidenciada que os o *Aspergillus flavus* UCP 1179, UCP 1185 e UCP 1186

e *Aspergillus parasiticus* UCP 1184 e UCP 1182 apresentaram produção superiores às demais amostras.

Os resultados obtidos da seleção evidenciam quantidades de biomassa acima de 2,0 g em 100mL de meio, nas amostras de *Aspergillus flavus* UCP 1179 com 2,05g UCP 1185 com 2,42g e amostra UCP 1186 com 2,56g e nos *Aspergillus parasiticus* , amostras UCP 1184 com 2,23 e UCP 1182 com 2,03g.

3.2 MICROCULTIVOS

As amostras apresentaram estrutura celular típica de um fungo eucariótico, possuindo conidióforo com filamentos ramificados, septados, as vesículas bem contornadas, boa visualização das células conidiogênica (fiálides) e conidiósporos. A técnica realizada correspondeu às características das estruturas reprodutivas assexuadas de *Aspergillus*, Características que confirmam o gênero. (Figura 2).

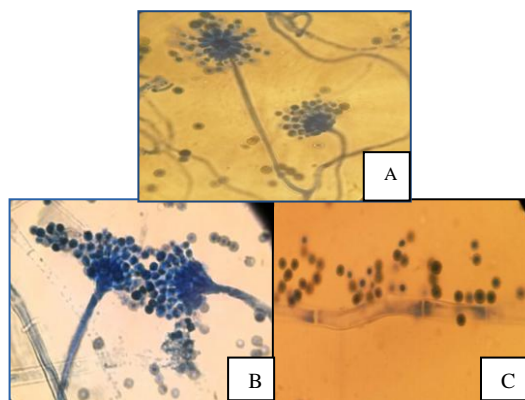


Figura 1. Microcultivo de *Aspergillus parasiticus*, observados em Microscopia Óptica objetiva 40x. conidióforo, célula conidiogênica (fiálides) e conidiósporos, vesícula bem contornada (A) e (B). Hifa visivelmente septada (C).

3.2 SELEÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDEOS TOTAIS

Estudos mostram que fungos filamentosos podem acumular percentuais elevados de lipídeos, acima de 20% da sua biomassa em óleos unicelulares, esses

micro-organismos são denominados de oleaginosos (RATLEDGE, 2002; PATNAYAK; SREE 2005; BANERJEE; MAIT, 2011; CASTANHA, 2012; LI, SHI LIN et al., 2012) .

O meio Czapek líquido recomendado para isolamento de *Aspergillus* propiciou aos micro-organismos do gênero a produção acima de 20% de lipídeos totais de sua biomassa. (Tabela 2) Isto sugere potencialidades para obtenção de produtos biotecnológicos, como por exemplo, biocombustíveis e fármacos.

Tabela 2. *Aspergillus* com melhores % de lipídeos totais, utilizando metodologias: FOLCH (1957) modificado por BLIGH; DYER (1959) e MANOCHA et al., (1980).

Amostras UCP	Micro-organismos	Biomassa g/100mL	% Lipídeos MANOCHA	% Lipídeos BLIGH, DYER
1082	<i>A. parasiticus</i>	2,03	44,2	27,5
1186	<i>A. flavus</i>	2,56	34,5	28,7
1179	<i>A. flavus</i>	2,05	37,3	32,5

O *Aspergillus parasiticus* UCP 1082 destacou-se com 2,03 g de biomassa e 44,2% de lipídeos intracelulares. Estes resultados comprovam que o aumento da produção de biomassa não esta necessariamente correlacionada com a produção de lipídeos totais.

Entre os fatores que contribuíram para um bom rendimento em lipídeos totais, e o resultado da extração pelo método MANOCHA et al., (1980), pode ser possivelmente atribuído ao processo de tempo de homogeneização constante aplicado nesta metodologia.

3.2 CITOQUÍMICA- COLORAÇÃO SUDAN BLACK

O corante Sudan Black, é utilizado para a avaliação de corpos lipofílicos ligeiramente solúveis em solvente orgânico e insolúvel em água, ao ligar-se a estruturas hidrofóbicas confere coloração negra azulada, visível em microscópio óptico (LELLIOT; STEAD, 1987).

A microscopia óptica permitiu a análise de grandes áreas em curto espaço de tempo, fácil e rápida

utilização e pouco dispendiosa o que possibilitou analisar os lipídeos intracelulares nas amostras de *Aspergillus*, caracterizando-os como micro-organismo oleaginoso. Como demonstra a Figura 2.



Figura 2. Coloração dos corpos lipídicos pela técnica Sudan Black, em hifa de *Aspergillus parasiticus*. UCP 1082.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados mostraram que as metodologias empregadas na extração de lipídeos totais, apresentaram um bom rendimento em ambos métodos, pois apresentaram um percentual lipídico acima de 20% de sua biomassa o que caracteriza as amostras de *Aspergillus* como oleaginosos. Os dados revelam uma alternativa promissora para o uso do *Aspergillus parasiticus* UCP 1182 como fonte de lipídeos totais.

O método de extração descrito por Manocha et al., (1980) evidenciou percentuais mais elevados dos lipídeos, tornando-se um método mais eficaz de extração de lipídeos totais das amostras testadas. Uma importante observação que não deve ser desconsiderada é a de que todos os métodos de extração apresentam rendimentos satisfatórios e em concordância com a literatura.

Os resultados mostraram que as metodologias empregadas descritas por BLIGH, DYER (1959) e MANOCHA et al., (1980) na extração de lipídeos totais, apresentaram um bom rendimento em ambos os métodos, pois resultaram um percentual lipídico acima de 20% de sua biomassa o que caracteriza as

amostras de *Aspergillus* como oleaginosos. Os resultados obtidos com *A. flavus* nas amostras UCP 1179 e UCP 1186 com 2,05g e 2,56g de biomassa obtiveram uma produção de lipídeos pelo método MANOCHA et. al.,(1980) de 37,3% e 34,5% respectivamente, comprovando que o aumento da produção de biomassa não esta diretamente relacionado com a produção de lipídeos totais.

Os resultados demonstraram que o *A. parasiticus* UCP 1182 é um micro-organismo oleaginoso que obteve uma produção de biomassa inferior as demais amostras, porém produziu um percentual superior de lipídeos totais com 44,2%, tornando-o viável para ser melhor analisado em estudos posteriores.

AGRADECIMENTOS

A CAPES pela bolsa de estudo e financiamento do projeto do SISBIOTA/ CNPq/ FACEPE. Aos técnicos e o Núcleo de Pesquisa de Ciências Ambientais e Biotecnológicas- NPCIAMB-Universidade Católica de Pernambuco- UNICAP.

REFERÊNCIAS

ABREU, J. A. S. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Revista UNINGÁ Review**. v. 21,n.1, p.55-59. 2015.

DEY, P; BANERJEE, J; MAITI, M K. Comparative lipid profiling of two endophytic fungal isolates– *Colletotrichum* sp. And *Alternaria* sp. having potential utilities as biodiesel feedstock. **Bioresource technology**, v. 102, n. 10, p. 5815-5823, 2011

BLIGH, E G; DYER W.J. A Rapid method of total extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry**. Ottawa, v.37, n.18, p.911-917, 1959.

CASTANHA, R. F. Utilização de soro de queijo para produção de lipídeos por leveduras oleaginosas. 2012. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola, Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2012.

- CERTIK, M.; SLAVIKOVA, L.; MASRNOVÁ, S.; SAJBIDOR, J. Enhancement of nutritional value of cereals with γ -linolenic acid by fungal solid-state fermentations. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, v.44 n1 p. 75-82, 2006.
- DHILLON, G. S. et al. Biotechnological potential of industrial wastes for economical citric acid bioproduction by *Aspergillus niger* through submerged fermentation. **International Journal of Food Science and Technology**, v.47, p.542-548, 2012
- LELLIOT, R. A.; STEAD, D. E. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. **Palo Alto**, Blackwell, 1 ed., v. 216, p. 171-172, 1987.
- LEHNINGER, A.L. . Bioquímica. 4ª Ed. São Paulo: Sarvier. 2006.
- LI, SHIN. LIN. et al. Biodiversity of the oleaginous microorganisms in Tibetan Plateau. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 627-634, 2012.
- LIU, Y.; ZHAO, Z. K.; BAI, F.. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 3, p. 312-317, 2007.
- MANOCHA, M. S.; SAN-BLAS, G.; CENTENO, S.. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. **Journal of General Microbiology**, v. 117, n. 1, p. 147-154, 1980.
- MATA-GOMEZ, M. et al. A Novel tannase from the xerophilic fungus *Aspergillus niger* GH1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, n.9, p.987- 996, 2009.
- MENG, et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable energy**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 2009.
- MURPHY, D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progress in Lipid Research**. V.40 N.5 P. 325-438 2001.
- NELSON, D.L.; COX, M.M.; LEHNINGER: Princípios da Bioquímica. 3ª Ed. São Paulo. 2002.
- PATNAYAK, S.; SREE, A. Screening of bacterial associates of marine sponges for single cell oil and PUFA. **Letters in applied microbiology**, v. 40, n. 5, p. 358-363, 2005.
- PATRO, K. R. et al. Development of new medium composition for end production of L-asparaginase by *Aspergillus* f. **Journal of Environmental Biology**, v.35, p.295-300, 2014
- POLI, J. S. Otimização da produção e caracterização do óleo microbiano produzido pela levedura *Yarrowia lipolytica* QU21. 2014 105 f. Tese (Doutorado) Programa de pós graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. 2014
- RAMALHO H; F.; SUAREZ, P.A. Z. A Química dos Óleos e Gorduras e seus Processos de Extração e Refino. **Revista Virtual de Química**. v. 5, n.1.p 2-15, 2013.
- RATLEDGE, C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, n. 6, p. 1047-1049, 2002.
- RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 807-815, 2004.
- RATLEDGE, C. Microorganisms for lipids. In: MEESTERS, P. A.; HUIJBERTS, G. N. High-cell density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.45, n.5, p.575-579, 1996.
- RASCHKE D.; KNORR D. Rapid monitoring of cell size, vitality and lipid droplet development in oleaginous yeast *Waltomyces lipofer*. **Journal of Microbiological Methods** v.79, p.178-183. 2009.
- RIDDELL, R.W. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. **Mycologia** n.42 p.265-270. 1950.
- ROSSI, M., AMARETTI, A., RAIMOND, S., LEONARD, A. Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi, Biodiesel - Feedstocks and Processing **Technologies**.Ed. Dr. MargaritaStoytcheva. ISBN: 978-953-307-713-0. 2011

SILVA K. P. Produção de lipídios por microrganismos através de fermentação em estado sólido. XXII Mostra de Iniciação Científica. Ecossustentabilidade. UPF.2012

SHEEHAN, H. L.; STOREY, G. W. An improved method of staining leucocyte granules with Sudan black B. **The Journal of pathology and bacteriology**, v. 59, n. 1- 2, p. 336-337, 1947.

TANIMURA, A. et al. Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel

production. **Bioresource technology**, v. 153, p. 230-235, 2014.

ZAHA, Ar.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. MP. *Biologia Molecular Básica-5*. Artmed Editora, 2014.

ZHENG Y. et al. Feasibility of filamentous fungi for biofuel production using hydrolysate from dilute sulfuric acid pretreatment of wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, p. 5- 50, 2012.

CAPÍTULO III

Aspergillus parasiticus UCP 1182 COMO RECURSO NATURAL RENOVÁVEL PARA PRODUÇÃO DE ENERGIA ATRAVÉS DA BIOMASSA

Nairane S. Rosa Leão^{a,*}; Roberta L. S. Reis^a; Grayce Kelli B. Silva^a; Jaceline M.N. Lima^a; Adriana Ferreira de Souza^a; Daylin Rubio Ribeaux^a; Ricardo Kenji Shiosaki^b; Kaoru Okada^a

^aNúcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia- NPCIAMB. Universidade Católica de Pernambuco, Rua Nunes Machado nº 42 Bloco J Boa Vista, 50050-590. Recife-PE Brasil

^bUniversidade de Pernambuco - UPE - Campus Petrolina, Pernambuco. Doutor em Ciências Biológicas. Universidade Pernambuco-Rodovia BR 203, Km 2 - Vila Eduardo, CEP: 56328-903. Petrolina – PE

() [Manuscrito com material suplementar](#)

(X) [Manuscrito sem material suplementar](#)

*e-mail: nairane.rs@gmail.com

ASPERGILLUS PARASITICUS UCP 1182 AS NATURAL REMEDY FOR RENEWABLE ENERGY PRODUCTION BY BIOMASS. The use of microbial lipids presents itself as a new renewable source and is used as innovation in pharmaceuticals and as an energy source (biodiesel). This study aimed to carry out the analysis of the production of total lipids, the profile of the characterization of fatty acids and activity antioxidant by *Aspergillus parasiticus* UCP 1182, in liquid and alternative means *Czapek* (cane molasses bagasse and corn steep liquor). Fermentations took place in 100 mL of the production medium at 28 °C under orbital shaking 150 rpm for 96 h and was held for 2³ factorial design alternative means. The results indicated that the *Aspergillus parasiticus* UCP 1182, grown in *Czapek* medium liquid, 0,968g achieved a production of biomass and lipids 44.2%, while in alternative means of production (molasses sugar cane and corn steep liquor) obtained in test (8) 2,83g biomass to 48.9 % lipids. The fatty acid profile grown in *Czapek* medium liquid, indicated the presence of linoleic fatty acid (36.54 %), and oleic (33.95 %). And the compound favored alternate means of production linolenic acid (28.66 %) and linoleic acid (40 %). In oxidant activity, we obtained the EC50 of *DPPH* was 4.06774 mg / mL lipid extract of *Aspergillus parasiticus*.

Keywords: lipids, organic residues, molasses of sugarcane, corn steep liquor.

INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas, a busca por combustíveis alternativos e renováveis ganhou importância devido as crescentes preocupações ambientais e com a perspectiva de esgotamento de fontes energéticas de origem fóssil, sendo apontadas como uma das soluções para mitigar problemas energéticos, e até mesmo obtenção de novos produtos.^{26,16,72,79}

Os avanços recentes na genética, biotecnologia, química de processos, e de engenharia estão transformando os conceitos e a conversão de biomassa renovável uma fonte substitutiva do petróleo, para uso em biocombustíveis.^{19,61,62} A biomassa seja ela de plantas oleaginosas ou proveniente de oleos de micro-organismos podem ser considerada como a fonte de energia renovável mais popular, por estar disponível de forma abundante e tecnicamente flexível.^{75,77,58,79}

O processo de obtenção de energia a partir de biomassa fúngica se baseia na capacidade que os micro-organismos têm de converter a energia química da biomassa em energia útil, além disso, esse tipo de energia não provoca impactos ambientais negativos e nem envolve a produção de materiais perigosos, sugerindo que a biomassa de micro-organismos é adequada para conversão em energia de biomassa.^{19,48,34,38,40}

Os micro-organismos oleaginosos possuem a capacidade de produzir mais de 20% de seu peso e podendo chegar à capacidade de acumular até 70% durante o período de estresse metabólico produzindo óleos unicelulares compostos triacilgliceróis, que contêm ácidos graxos, como o ácido palmítico, esteárico e oleico que são bem adequados para aplicação do biodiesel ou até mesmo ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) de importância nutricional e utilizações industriais e farmacêuticas,^{50,35,30,78,48,69} convertendo a energia química da biomassa, em energia útil, considerado um processo limpo de produção de energia e fonte nutricionalmente valiosas, não provocando impactos ambientais em sua produção.^{9,39,69}

Assim sendo, a produção industrial de óleo a partir de micro-organismos em relação a outras fontes oleaginosas mais vantajosa, por apresentar sobre tudo a não necessidade de grandes extensões de terras agriculturáveis, o uso de enormes quantidades de água, evita a poluição do solo e o desmatamento reservas ambientais, pois estes são os principais fatores que afetam a agricultura.^{51,13,20,27}

Devido ao rápido crescimento e adaptação de micro-organismos oleaginosos em diversos meios de cultivo e nos mais diferentes substratos, esses são apresentados como uma alternativa de inovação biotecnológica. Pesquisas mostram que a utilização de resíduos agroindústrias

destaca-se no cultivo de micro-organismos como uma alternativa inovadora por conterem grande quantidade de matéria orgânica, reduzindo no custo de produção como também no descarte no meio ambiente.^{45,26,73,38,4}

Na direção do desenvolvimento sustentável, o melaço de cana-de-açúcar e a milhocina, se destacam, pois podem ser empregados para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos de interesse industrial. O melaço devido à presença de grande quantidade carbono para o metabolismo microbiano.³ Além disso, em sua composição estão presentes nitrogênio, fosfatos, cálcio e magnésio, zinco, manganês, cobre e ferro,^{74,15} nutrientes importantes para o metabolismo celular.

A milhocina é considerada uma excelente fonte de carbono e/ou nitrogênio para os micro-organismos por conter em sua composição aminoácidos, vitaminas e sais minerais. A utilização de fonte de nitrogênio para o crescimento microbiano e produção de metabólitos torna-se essencial, pois o nitrogênio está intimamente relacionado ao metabolismo dos micro-organismos, essencial para o crescimento celular.^{60,25,76,18}

Neste sentido busca-se, ampliar e estimular o consumo das energias alternativas e obtenção de bioprodutos, proveniente de micro-organismos oleaginosos, traduzindo-se num incontestável fator para o desenvolvimento responsável e sustentável, principalmente objetivando a preservação e a conservação do meio ambiente.

PARTE EXPERIMENTAL

Micro-organismos

Foi utilizadas amostras de *Aspergillus parasiticus* UCP 1182, isoladas do Semiárido de Pernambuco, mantidas no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), da Universidade Católica de Pernambuco, registradas no World Federation Culture for Collection-WFCC, sendo mantidos em meio Sabouraud (SAB) à 5 °C.

Cinética de Crescimento do micro-organismo

A concentração celular de *Aspergillus. parasiticus*, foi determinada gravimetricamente após filtração. O sobrenadante obtido foi utilizado para determinações analíticas, realizadas em triplicata, a cada 24 h do processo fermentativo em meio alternativo, ao total de 144 h.

Meios de Cultura

Foram utilizado meio de manutenção Sabouraud (SAB), meio de crescimento Batata Dextrose Ágar (BDA), meio de produção *Czapek* líquido e meio de produção resíduos agroindustriais Milhocina e Melaço de cana-de-açúcar conforme planejamento fatorial. Os componentes foram liquefeitos e esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 min.

Condições de cultivo e de crescimento

O crescimento de cada espécie foi realizados em meio BDA por 5 d, onde os esporos foram coletados com o uso de swabs, transferidos para água destilada esterilizada em frascos de penicilina e determinado o número de 10^7 esporos/mL na câmara de Neubauer. Alíquotas de 5 mL da suspensão de esporos, foram transferidas para o meio de produção .

Processo fermentativo

Foram utilizados frascos de Erlenmeyers com capacidade contendo 100mL dos meios de produção. Foram inoculados 5% da suspensão de esporos contendo 10^7 esporos/ mL, mantidos sob agitação orbital de 150 rpm, a temperatura de 28 °C, por um período de 96 h para obtenção da biomassa, após este período houve a filtração da biomassa e encaminhamento para liofilização.

Planejamento Fatorial

Este planejamento visa avaliar a influência dos principais fatores, bem como suas interações. Foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 com 12 ensaios incluindo quatro (4) repetições no ponto central, tendo como variáveis independentes pH e as concentrações de melaço de cana-de-açúcar e milhocina, como variável resposta a biomassa e a concentrações de lipídeos. Os níveis e valores das variáveis independentes do planejamento estão especificadas como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Planejamento fatorial completo 2³ com variáveis independentes: pH, concentrações de melão e Milhocina, para produção de lipídeos totais

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Melão de cana-de-açúcar	15	20	25
Milhocina	2	3	4
pH	4	6	8

Extração e determinação de lipídeos totais

Os lipídeos foram extraídos de acordo com o método descrito por Folch²⁴ modificado por Manocha³⁶ onde 1,0 g da biomassa liofilizada foram submetidas à extração sucessivas de lipídeos por três vezes, usando clorofórmio: metanol (2:1; 1:1; 1:2 v/v). O material foi agitado por 15 min, posteriormente homogeneizado por 24 ho, após cada troca de solvente. Durante os intervalos da extração o sobrenadante foi separado da biomassa por centrifugação a 5000 g, por 10 min e a biomassa submetida a uma nova extração. Os extratos foram reunidos e evaporados até a secura no rotoevaporador. Em seguida 1 a 2 mL de hexano, foi utilizado para recuperar os lipídeos, que depois foram evaporados sob atmosfera de nitrogênio e mantidos no dessecador até peso constante. A quantidade de lipídeos presentes da biomassa foi determinada por método gravimétrico. As respostas para a produção de lipídeos foram calculadas em termos de concentração de lipídeos (g/L⁻¹) e ou lipídeos totais (%) equação 1.

$$\text{Lipídeos Totais (\%)} = \frac{\text{massa de lipídeos (g)} \times 100}{\text{biomassa seca (g)}} \quad (1)$$

Caracterização dos Ácidos Graxos

Para realização da caracterização dos ácidos graxos os micélios foram colocados em tubos de ensaio com tampa, colocados 3 mL de uma solução trifluoreto-boron a 14 % de metanol e 3 mL de benzeno, incubados a 60 °C , “over-night”. Ácidos graxos foram convertidos a ésteres de metil de acordo com o método ²¹ Após a incubação, 4 mL de água destilada foram adicionados e extraídos os ácidos graxos, a mistura foi centrifugada a 5000 g a 4 °C . O benzeno foi separado

por centrifugação, removido e evaporado com nitrogênio. O metil ésteres de ácidos graxos foram solubilizados em hexano e analisados em cromatografia gasosa (CG). As análises foram realizadas em um Cromatógrafo gasoso. Trace GC Ultra, equipado com coluna capilar Carbowax HP- 20M (25 m x 032 mm x 0.3 µm). Temperatura inicial da coluna 40 °C, mantido por 1 min. Aumentada para 150 °C a 55 °C por min. Em seguida aumentada para 220 a 1,7 °C por min. A temperatura do detector é mantida em 220 °C e a do injetor 200 °C. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio mantido em fluxo constante a 1 mL por min. O volume de amostra injetado foi de 1 µL, em modo split de 1 para 20.0 padrão utilizado para identificação é o F.A.M.E. Mix C4-C24 SUPELCO (código 18919). Quantidades relativas de metil ésteres foram calculados pela integração das áreas de picos.

Atividade antioxidante

A dosagem de atividade antioxidante foi realizada pelo método fotolorimétrico *in vitro* do radical livre estável *DPPH* (2,2- difenil-1 - picrilidrazila) obtido da SIGMA. Nesse método é preparada uma solução 0,3 mM de *DPPH* em etanol. As amostras são preparadas adicionando-se 1 mL desta solução de *DPPH* a 2,5 mL de soluções dos extratos diluídos em etanol e aguarda 30 mins em temperatura ambiente para leitura a 518 nm. Como branco, o *DPPH*, foi substituído por 1 mL de etanol mais 2,5 mL do extrato. O controle é preparado apenas com 1 mL de *DPPH* e 2,5 mL de etanol. A solução de *DPPH* possui uma coloração roxa intensa e a ação antioxidante de um extrato pode ser visualizada pelo progressivo descoloramento da solução, ao final do qual a mesma torna-se amarelada. Trinta min após a adição de *DPPH* às amostras, é feita a leitura em um espectrofotômetro de Ultravioleta UV-vis Shimadzu UV 1601 em 518 nm. Todas as leituras foram realizadas em triplicata e, com a média dos dados obtidos foi calculada a diferença de absorvância entre a amostra e o branco e as atividades antioxidantes percentuais foram obtidas por regressão linear, logarítmica ou exponencial para cada extrato, chegando-se assim à concentração necessária para se obter 50 % do efeito antioxidante máximo estimado de 100 % (EC50).³⁷ Após as absorvâncias (Abs) foram lidas e calculadas em percentual de atividade antioxidante (AA), usando a equação 2:

$$AA \% = \frac{100 - [(Abs\ amostra - Abs\ branco) \times 100]}{(Abs\ controle - Abs\ Branco)} \quad (2)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de Biomassa e Lipídeos Totais em meio Czapek Líquido

O *Aspergillus parasiticus*, apresentou 2,03 g de biomassa e 44,2 % de lipídeos totais. Apresentando-se como micro-organismo oleaginoso e produzindo um percentual elevado de lipídeos totais.

Cinética de Crescimento do micro-organismo

Dos dados obtidos observou-se inicialmente que houve um crescimento constante de biomassa até 96 h e após passou para o período estacionário até 144 h não havendo fase de declínio. Já na produção de lipídeos teve um pico como conhecido fase LOG ou exponencial até 72 h permanecendo estacionário até 96 h, onde logo após obteve um leve caimento entre 96 e 120 h , sendo este fenômeno conhecido como diauxia, onde o micro-organismo tem preferencia por um substrato e consome-o totalmente antes de iniciar o consumo de outro substrato presente no meio, sendo de 120 h teve logo um rápido crescimento exponencial até 144 h, onde não ficou evidente a fase de declínio. O pH do meio estabelecido foi 8,0 porém sofreu pequena variação de 8,0 e 8,3 não demonstrando interferencia no crescimento. Conforme mostra a Figura 1.

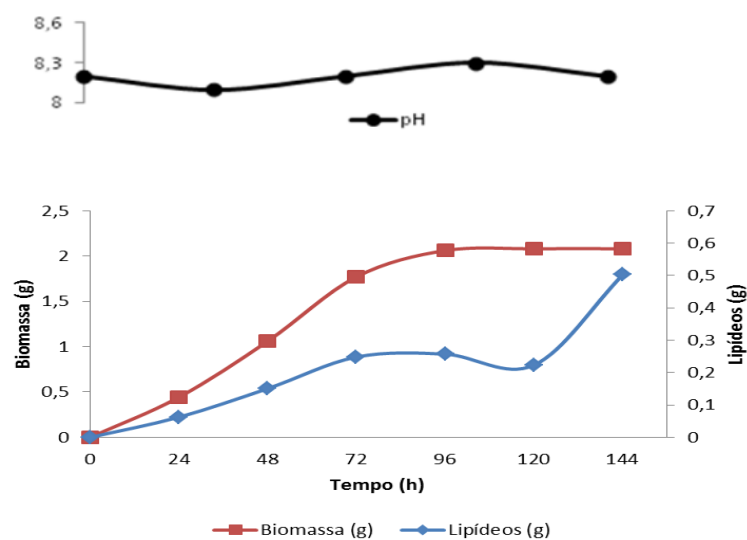


Figura 1. Curva de crescimento do *Aspergillus parasiticus* UCP 1182 em meio alternativo

Planejamento Fatorial e avaliação estatística da influência dos meios residuais na produção de lipídeos totais

Com o planejamento fatorial 2^3 , com 12 ensaios incluindo quatro (4) repetições no ponto central. Foi possível verificar que o ensaio (8) se destacou entre os demais ensaios, quanto a obtenção de lipídeos totais, conforme Tabela 2.

Tabela 2. Planejamento fatorial completo 2^3 com variáveis independentes: pH, biomassa e Lipídeos e variáveis dependentes: biomassa e concentrações de lipídeos

Ensaios	Melaço	Milhocina	pH	Biomassa (g)	Lipídeos %
1	-1	-1	-1	2,84	32,5
2	+1	-1	-1	2,36	30,5
3	-1	+1	-1	2,88	25,2
4	+1	+1	-1	2,68	29,3
5	-1	-1	+1	3,15	31,2
6	+1	-1	+1	2,88	32,4
7	-1	+1	+1	3,39	41,3
8	+1	+1	+1	2,83	48,9
9	0	0	0	3,74	26,9
10	0	0	0	3,19	33,3
11	0	0	0	2,92	32,4
12	0	0	0	2,84	31,8

Os resultados comprovam que o aumento da produção de biomassa não está necessariamente correlacionada com a produção de lipídeos totais. Pois ensaio (7) com 3,39 g/mL e (9) 3,74 g/ mL de biomassa, obtendo um percentual de 41,3 % e respectivamente 26,9 % de lipídeos totais, mostrando-se bons produtores de lipídeos, porém com percentuais inferiores ao ensaio (8) o qual produziu 2,83 g/ mL de biomassa e 48,9 % na produção de lipídeos totais.

O ensaio (8) apresentou uma quantidade elevada de melaço, uma fonte de carbono abundante e a milhocina como fonte de nitrogênio, porém reduzida quando comparado ao carbono presente no melaço. Enquanto nos outros dois ensaios (7) e (9) possuíam quantidades inferiores de principalmente da fonte de carbono. Constatando que o fator que determina o acúmulo de lipídeos em micro-organismos é a razão Carbono/ Nitrogênio (C/N), sendo que o excesso de carbono e condições limitantes de nitrogênio favorece o processo, sendo assim a limitação de nitrogênio é a condição mais eficiente para induzir a lipogênese.^{41,47,55}

Os fungos filamentosos oleaginosos possuem capacidade de acumular acima de 20% de lipídeos de sua biomassa em lipídeos,^{52,5,55} em contrapartida a soja uma das matérias primas utilizada para produção de biodiesel no Brasil pode se extrair 20% de óleo para fabricação do Biodiesel.⁴² Mostrado que o fungo filamentoso *A. parasiticus* apresentou percentual de lipídeos favorável quando cultivado em meio alternativo.

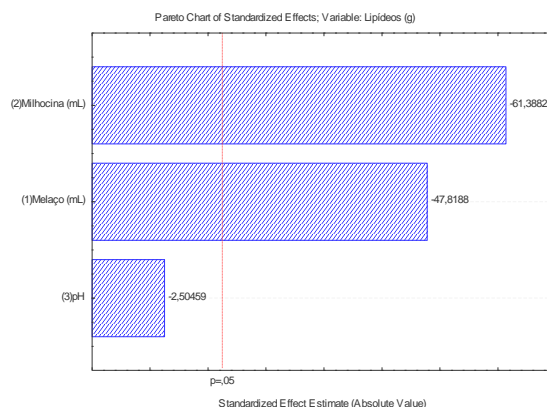


Figura 2. Diagrama de Pareto para produção de Lipídeos totais em meio alternativo

O diagrama de Pareto apresenta a significância dos resultados, com 95 % de confiança, representado pela linha tracejada, correspondente ao valor de $p = 0,05$, confirmando os resultados obtidos nas alturas das barras que fornecem os resultados dos efeitos das variáveis e estão dispostas de modo decrescente.

Observando o gráfico é possível afirmar que as variáveis milhocina e melaço ultrapassaram o valor de $p = 0,05$, no nível de confiança 95 %, comprovando que são valores estatisticamente significativos. Nota-se que a milhocina e o melaço foram as variáveis que mais influenciaram no processo da produção de lipídeos, entretanto, essa influencia é negativa (-) , isto é, se diminuir esta concentração a produção lipídeos tende aumentar.

Caracterização dos Ácidos Graxos

O perfil dos ácidos graxos é um dos principais fatores que determinam adequação de qualquer matéria-prima para utilização na produção de biodiesel para produção de combustível.³³

Os resultados obtidos com a extração e metilação dos ácidos graxos da biomassa seca, cultivada em meio Czapek, o *Aspergillus parasiticus* apresentou maior concentração de ácidos graxos insaturados, linoleico 36,54 %, seguido do ácido oléico 33,95 %, conforme a Tabela 3.

Tabela 3. Composição dos ácidos graxos extraídos da biomassa cultivados em meio *Czapek*

ÁCIDOS GRAXOS	TEORES %
SATURADOS	
Mirístico (C14:0)	0,2
Pentadecanóico (C15:0)	0,31
Palmítico (C16:0)	17,26
Margárico (C17:0)	0,33
Esteárico (C18:0)	9,12
Araquídico (C20:0)	0,71
Behênico (C22:0).	0,94
MONIINSATURADO	
Oleico (C18:1)	33,95
Eicosenóico (C20:1)	0,30
POLIINSATURADO	
Linoleico (C18:2)	36,54
Linolênico (C18:3 ω -3)	0,28

O perfil dos ácidos graxos apresentado é bastante característico das características químicas do óleo de soja, uma das matérias prima comum para produção de biodiesel, constituído ácido linoléico 54.5 % e oléico 22.3 %, sendo os demais saturados, apresentando este perfil, o ponto de fusão desses ácidos graxos é interessante para produção de biodiesel, -5 °C para linoléico e 4 °C, dificultando o congelamento do produto, porém os ácidos graxos saturados e muitos poliinsaturados promovem o aumento de névoa (aumento da turgidez com a baixa temperatura), e de entupimento.⁷⁰

No Brasil, as temperaturas são amenas, não apresentando problema de congelamento do biodiesel, mas representando problemas para regiões climáticas de temperatura baixa e moderada.^{31,28}

Porém a presença de ácidos graxos saturados favorece a qualidade de ignição, número cetano, onde este diminui com um comprimento de cadeia decrescente, aumento da ramificação, porém aumenta com lipídeos compostos por ácidos graxos saturados. Portanto não existe um único ácido graxo que é responsável por toda a propriedade particular do combustível.²⁸

As desvantagens dos óleos vegetais compostos por ácidos graxos que apresentam insaturados e poliinsaturações são mais propensos a processos oxidativos, principalmente

aqueles com proporções variáveis dos ácidos oléico (C18:1), linoléico (C18:2) e linolênico (C18:3).²⁸ Portanto quanto menos insaturação mais estabilidade. A velocidade das reações de oxidação para estas moléculas depende do número e da posição das duplas ligações.^{22,23,71,44}

A composição de ácidos graxos extraídos da biomassa cultivada em meio alternativo mostra o percentual individual da concentração de ácidos saturados, totalizando em 30,78 % e ácidos graxos insaturados de 69,2 %. Conforme tabela 4. Não foi apresentado ácido graxo monoinsaturado, como o ácido oléico, um ácido graxo monoinsaturado, cuja sua presença em porcentagem elevadas, apresenta maior estabilidade à oxidação, em comparação a outros insaturados.

Ésteres de ácidos graxos insaturados, especialmente poliinsaturados dificultam o congelamento, devido aos seus pontos de fusão mais baixos, que são desejáveis, mas também reduzem o número de cetano e a estabilidade de oxidação, que é indesejável para o combustível,³² porem os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) são atualmente atraindo cada vez mais atenção devido sua importância nutricional, utilizações industriais ou farmacêuticos.⁶⁹

Tabela 4. Composição de ácidos graxos identificados no lipídeo extraído da biomassa liofilizada de *A. parasiticus* cultivado em meio melaço de cana-de-açúcar e milhocina por 96h.

Ácidos graxos	Teores %
	<i>A. parasiticus</i>
Palmítico (C16:0)	18,70
Esteárico (C18:0)	12,08
Linoleico (C18:2)	40,54
Linolênico (C18:3 ω-3)	28,66

A produção de ácidos graxos por este micro-organismo em meio composto por melaço e milhocina, favoreceram a produção do ácido graxo linolênico (C18:3 ω-3), com alto percentual de 28,66%, além do ácido graxo linoléico (ω-6), com 40,57%. Portanto seria inviável a produção de biodiesel pelo óleo produzido por este fungo filamentosos nestas condições, uma vez também, por produzir uma ótima produção de ômega-3, sendo este de alto custo e viável para a indústria farmacêutica e alimentícia.

O ácido linoléico e o ácido linolênico são ácidos graxos essenciais, pois não podem ser sintetizados pelos mamíferos, por não possuírem a enzima delta9-dessaturase, devendo estes serem obtidos obrigatoriamente a partir da dieta.³⁹

Os ômega-3, α – linolênico e γ – linolênico, são considerados antiinflamatórios, antitrombóticos, antireumáticos e reduzem os lipídeos sanguíneos além de propriedades

vasodilatadoras, efeitos benéficos na prevenção de doenças cardíacas, da hipertensão, do diabetes tipo 2 e da artrite reumatóide.⁴⁶

O ácido linoléico apresenta o potencial rápido de cicatrização de feridas, por abreviar a fase inflamatória quando ingerido. O tratamento tópico está relacionado à hidratação e elasticidade da pele que impedi a entrada de micro-organismos e a perda de água para o meio externo.⁵⁴ Sendo assim, a fonte de ácido linoléico por micro-organismos também parece promissora para área farmacêutica.

Atividade Antioxidante

A geração de radicais livres está diretamente relacionada a processos oxidativos, porém, se a produção destes radicais supera a capacidade antioxidante em um sistema vivo, estes podem reagir com lipídeos, proteínas e com o DNA conduzindo a danos estruturais/ funcionais nas células, enzimas e material genético levando a inúmeras patologias.^{68,43,56}

Os resultados obtidos foram avaliados a partir da capacidade do DPPH em reagir com os doadores de hidrogênio, na presença de substâncias antioxidantes o mesmo recebe H⁺ sendo então reduzido. Pode ser facilmente detectado por espectroscopia devido a sua intensa absorção na região visível.^{11,37,57} O radical DPPH quando estável possuía coloração púrpura, porém quando reduzido vai clareando o tom e passa a ter coloração amarela no final.¹⁷

Alguns autores recomendam a utilização do método DPPH por ser um recurso fácil e preciso para a avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais.^{37,53,1,7,12,6,63,67,64,29,43} a concentração do extrato e atividade antioxidante do *Aspergillus parasiticus* é mostrado conforme Tabela 5.

Tabela 5. Concentração do extrato e atividade antioxidante do *Aspergillus parasiticus*

Concentração do extrato (µg/mL)	Atividade Antioxidante (%)
20	11,67
40	29,34
50	44,16
60	50,16
70	66,25
80	68,56
100	82,12
150	90,85
200	94,64
250	98,74

Os radicais livres e outros oxidantes, vem sendo considerados nos últimos anos como grandes causadores de várias doenças como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune, disfunções cerebrais e diabetes mellitus tipo I. ⁶⁶ No entanto, quando em excesso, podem gerar o estresse oxidativo (EO), que pode ser definido como as circunstâncias nas quais os radicais livres causam danos teciduais. O excesso desses radicais pode ser combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou adquiridos de forma exógena. ⁶⁶

A Quantificação da concentração do extrato e atividade antioxidante foi realizada através da calibração do extrato. (figura 3), A equação da reta obtida ($y = 9,5294x + 11,237$ e $R^2 = 0,9674$) foi empregada para determinar a concentração $\mu\text{g/mL}$ de extrato lipídico e atividade antioxidante, onde X corresponde a concentração do extrato e Y atividade antioxidante da amostra (AA%).

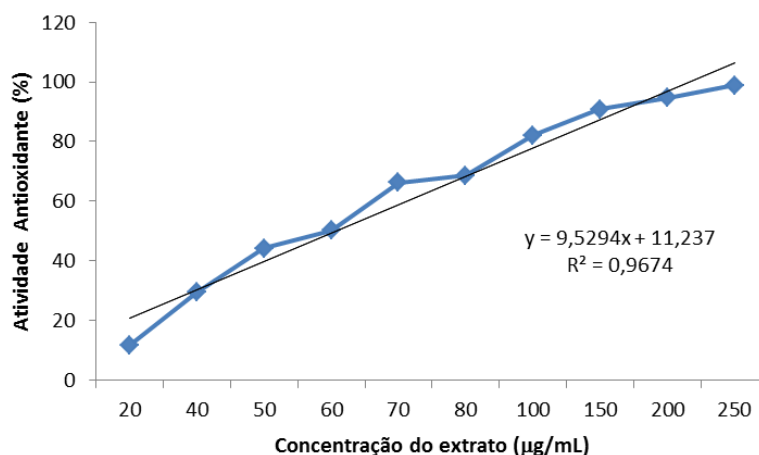


Figura 3. Gráfico da curva de crescimento atividade antioxidante

O DPPH radical é geralmente quantificado em termos de porcentagem de inibição do pré-formado de radicais livres pelos antioxidantes, e o valor de EC50 (concentração necessária para obter um efeito antioxidante 50%) é um parâmetro normalmente utilizado para expressar a capacidade antioxidante e de comparar a atividade dos compostos diferentes. ^{37,17}

Após realizar as leituras e com as médias obtidas foi calculada a diferença de absorbância entre a amostra e o branco e as atividades antioxidantes percentuais foram obtidas por regressão linear, para cada extrato, chegando-se assim à concentração necessária para se obter 50% do efeito antioxidante (EC50), onde obteve-se a concentração de $x = 4,0677 \mu\text{g/mL}$.

Demonstrando que em 4,0677 µg/mL da concentração do extrato lipídico do *Aspergillus parasiticus* possui ação antioxidante. A capacidade da amostra de reduzir o DPPH, ou seja, evitar sua oxidação, é evidenciada pela porcentagem de DPPH restante no sistema. Então a porcentagem de DPPH restante é proporcional a concentração de antioxidante.^{11,57}

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam o potencial biotecnológico do gênero *Aspergillus parasiticus* UCP 1182, como micro-organismo oleaginoso possuindo a capacidade de produzir e acumular lipídeos em percentuais acima de 20%, caracterizando-os como micro-organismos oleaginosos. De acordo com a literatura o uso de lipídeos fúngicos é efetivo para produção de biocombustíveis conforme o perfil de ácidos graxos apresentados em cultivo no meio *Czapek*.

O cultivo com resíduos agroindustriais milhocina e melão de cana-de-açúcar, utilizado nos experimentos, mostraram-se um perfil de ácidos graxos, promissor e viável na formulação de meio de cultivo para obtenção de bioprodutos na área farmacêutica e alimentícia.

O *Aspergillus parasiticus* UCP 1182 mostrou-se com capacidade antioxidante e comparadas ao substrato oxidável retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato quando aumentadas as concentrações do extrato. Os resultados demonstraram que o *A. parasiticus*, torna-se viável em estudos posteriores.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES pela bolsa de estudo e financiamento do projeto do SISBIOTA/ CNPq/ FACEPE. Aos técnicos e o Núcleo de Pesquisa de Ciências Ambientais e Biotecnológicas- NPCIAMB, à infraestrutura da Universidade Católica de Pernambuco- UNICAP.

REFERÊNCIAS

1. Aaby, K., Hvattum, E., Skrede, G.; *Agric. Food chem.* **2004**, 52, 4603,.
2. Adrio, D.A.L.; *Molecular Biotechnology*, **2008** 38, 55.
3. Altaf, M. D.; Naveena, b. J.; Venkateshwar, M.; Kumar, e. V.; Reddy, G. *Process Biochemistry*, **2006**, 41, 2, 472.
4. Alvim, J. C. et al. *Journal of Bioenergy and Food Science*, **2015**, 1, 3.
5. Almeida, F. I R.G; Azeiteiro, U. M. *Rev. Captar: Ciênc. Amb. Todos*, **2014**, 3, 2,
6. Anagnostopoulou, M.A.,Kefalas,P.,Papagerogiou,V.P., Assimopoulou, A.N.,Boskou, D. *Food chemistry*, **2006** , 94, 25.
7. Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G.,Kefalas, P. *Food chemistry*, **2005**, 89 ,36.
8. Bertin R, Frold G.i, Chen, *Food chemistry*, **2013** , 138, 1, 420.
9. Buckley, M.; Parede, J. *Soc. Americ. Microb.* **2006**
10. Bligh, E.G., Dyer, W.J. *J. biochem. Physiol.* **1959**, 37, 917.
11. Bondet, V.; Brand-Williams, W.; Berset, C. *Food sci.technol.-leb.* **1997** .30, 615.
12. Cardoso, C.L., Silva, D.H.S. Castrogamboa, I., Bolzani, V.S. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2005**,16.
13. Certik, M.; Slavikova, L.; Masrnová, S.; Sajbidor, J. *Food Ttech. Biotech.*, **2006** ,4, 82.
14. Coelho S., Matai P. HLS, Grisoli R. *InterfacEHS-Rev. Saúde, Meio Amb. Sustentab.* **2010**, 4, 2.
15. Cortez,L. A. B.; Brossard Pérez, L. E. *Brazil. J. chem. Engin.* **1997**, 14.
16. Coutinho , P. ; Bomtempo, J.V. *Quim.Nova* **2011**, 34, 916.
17. Chen, Z.; Bertin, R.; froldi, G. *Food chemist*, **2013**, 138, 1, 420.
18. Daniels, Ralph S. **2013**, U.S. (8,568,758, 29).
19. Dey, P; Banerjee, J; Maiti, M K. *Bioresource techn.*, **2011**, 102. 10, 5823.
20. Demain, A. L.; Adrio, J. L. *Molec. Biotech.*, **2008**, 38, 55.
21. Durham, D. R., Kloos, W.E. *Int. J. Syst. Bacteriology*, **1978**, 28,228.
22. Freedman, B. E; Bagby, M. O. *J. American oil chem.Soc.*, **1989**
23. Ferrari, P. B. B. *Dissertação de Mestrado* - Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2012
24. Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G.H.S., *J. Biol. Chem.*, **1957** , 226, 1, 509.
25. Fontes, G. C.; Amaral, P. F. F.; Coelho, M. A. Z. *Quim. Nova Brasil*, **2008**, 31,8, 2099.
26. Goldenberg, J. *Quim. Nova*, **2009**, 32, 3, 587.
27. Gomes, J.A. et al. *Anais do Simpósio Internacional de Inovação Tecnológica-SIMTEC*, 2013.
28. Islam, A.M.; Ayoko, A.G.; Brown, R.; Heimann, k. *Procedia engineering*, **2013**, 56.
29. Jayaprakasha,G.K.,Negi,P.S.,Jena,B.S.,Rao,J.M. *J. Food comp. And analysis* , **2007**, 20, 336.

30. Kosa, Matyas; Ragauskas, Arthur J. *Trends in biotechn.*, **2011** 29, 2, 61.
31. Knothe, G.; Gerpen, J. V.; Krahl, J.; Ramos, L.P. Manual do biodiesel. Traduzido do original "the biodiesel handbook" por Luiz Pereira Ramos, São Paulo: edgard blucher. **2006**.
32. Knothe G., *Energy & fuels*, **2008** 22, 1364.
33. Knothe, G. . *J. Ener. Environ. Sci.* **2009** 10, 1054.
34. Liang, M.; Jiang, J. *Progress in lipid research*, **2013**, 52, 4, 408.
35. Liu, Y; Zhao, Z. Kent; Bai, *Enzyme Microb. Techn.*, **2007** 41, 3,317.
36. Manocha, M. S.; San-Blas, G. *J. General Microb.* **1980**, 117, 1, 154.
37. Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, dos Santos TC, Coube CS, Leitão SG, *Phytother Res.*, **2001**, 15, 130.
38. Morais, R. P. et al. *Sempesq*, **2014** , 16.
39. Moreira, R. M. et al. *Científ.*, **2014**, 08.
40. Muniraj, I. K. et al. *J. Scienc. Food Agricult.*, **2015**
41. Mulder, J. et al. 1972. *Symp. Biol. Hung.*, **1972** 11,333.
42. Noro, G. B. N., K. B. Frozza, M. Lengler, L. Análise de práticas sustentáveis na produção de biodiesel: um estudo de caso. IX SEGeT - Simpósio de Excelência em Gestão e Tecnologia. Brasil, 2012.
43. Oliveira, A. C. de et al. *Quim. Nova*, **2009**, 3, 2, 3, 702.
44. Oliveira, G. R. *Dissertação de Mestrado*. Universidade de Brasília, Brasil, 2015.
45. Pelizer, L.H. ;Pontieri, M.H.; Moraes, I.O. *Journal technol. Manag. Innovat.*, **2007**, 2.
46. Pescador, R. *Especialização* (2006) Universidade de Brasília, Brasil, 2006.
47. Raschke D.; Knorr D. *Journal Microb. Method*, **2009**, 79,183.
48. Ramalho H; F; Suarez, P.A. Z. *Rev. Virt. Quím.* **2013**, 5, 1, 15.
49. Ramos et al. *Rev. Virt. Quím*, **2011**; 3, 5, 405.
50. Ratledge, C. *Applied Microb. Biotech.*,**1996** , 45, 5 579.
51. Ratledge, C., *Biochimie*, **2004** 86,11, 815. (ISSN 0300-9084).
52. Ratledge, C., Wynn, J. P. *Adv. Appl. Microbiol.* **2002** 51, 51.
53. Ribeiro, A.B.; Silva, D.H. S.; Bolzani, V.S. *ecler. Quím.***2002** .27.
54. Rodrigues, H. G.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo (USP), Brasil, 2011.
55. Rossi, M. et al. *Intech Open Access Publisher*, **2011** (ISBN: 978-953-307-713-0)
56. Santos, A C. A. et al.. *Rev. Interd.*, **2014** 7, 3,156.
57. Sanchez-Moreno, C. (2002) Review: methods used to Evaluate the free radical scavenging activity in Foods and biological systems. *Food sci. Technol. Int.* 8:121-137.

58. Santos, V. E. N. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campos dos Goytacazes, Brasil 2013.
59. Santos M. M. H. et al. In: Embrapa Tabuleiros Costeiros-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: seminário de iniciação científica e pós-graduação da Embrapa tabuleiros costeiros, 4., Aracaju. Anais. Brasília. 2014.
60. Silveira, M. et al. *Applied microb.biotech.*, **2001** 55, 4, 445.
61. Silveira ,J. M. F. J.; Borges, I. C.; Buainain, A. M. São Paulo em Perspectiva., São Paulo, 19, 2, 2012.
62. Silva, D. F. et al. *Biochei. Biotech. Reports*,**2013** 2, 3esp.284.
63. Stratil, P., Klejdus, B., Kuban, V. *J. Agric. Food chem.* **2006**, 54,616.
64. Surveswaran, S., Cai, Y.Z., Corke, H., Sun, M. *Food chem.*, **2007**, 102,953.
65. Sousa, CM. M. et al. *Quim. nova*, **2007** 30, 2, 355.
66. Souza, V. F. *Especialização*, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2011.
67. Termentzi, A., Kefalas, p., Kokkalou, *Food chem.*, **2006**, 98, 608.
68. Tomei, R. R.; Salvador, M. J. Encontro latino americano de pós-graduação, Campinas. Anais. Universidade. Vale do Paraíba, . 1: 1967. 2007
69. Tsurkan, Y. et al. *J. Biotech Research*, **2015**, 6,20. (ISSN: 1944-3285),
70. Vieira, A.C., Vasconcelos, V. M., Silva, P. C.G., Oliveira, R. P. S., Silva, G. F. Winterização do óleo de soja associado à degomagem para a produção de biodiesel. Universidade Federal de Sergipe, Brasil, 2010
71. Vieira, S. S. *Tese de Doutorado*. Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil 2014
72. Vieira Neto. *Dissertação de Mestrado* . Universidade Federal de Santa Catarina. Brasil,2012
73. Vicente, G; Bautista, L. F.; Rodriguez, R.; Gutierrez, F. J.; S_Adaba, I.; Ruiz- Vazquez, R. M.; Torres-Martinez,S.; Garre, V. *Biochem.*, 2010.
74. Waliszewski,K.N.; Romero,A.; Pardo,V.T. *Animal feed scienc. Technol.* **1997**
75. Yucheng C. ; Pawłowski, *Renewable Sustainable Energy Reviews*, **2012** 16, 3, 1665.
76. Yong-lan X. et al., *Bioresource Techn.* **2013** (136:775–779).
77. Zancheta, A. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.UNESP. Brasil, 2012.
78. Zheng Y. et al. *Biotech. for biofuels*, **2012** , 50.
79. Zuniga, A.D. G. et al. *Rev. Interd Univers. Fed. Tocantins*, **2015**, 1, 278.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos dados obtidos durante a realização dos experimentos neste estudo, pode se concluir que:

- ✓ Através da citoquímica realizada pela coloração Sudan Black foi possível verificar o potencial de acumulação lipídica nas estruturas intracelulares das amostras de *Aspergillus*;
- ✓ Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam o potencial biotecnológico do gênero *Aspergillus parasiticus* UCP 1182 como micro-organismo oleaginoso demonstrando adaptação fisiológica ao meio de cultivo Czapek, evidenciando rendimento satisfatório na produção de biomassa e lipídeos totais superior as demais amostras do gênero, possuindo a capacidade de produzir e acumular lipídeos em percentuais acima de 20%;
- ✓ O meio de produção alternativo elaborado com resíduos agroindustriais com a introdução de melaço de cana-de-açúcar e milhocina proporcionaram um bom crescimento e uma fonte de reaproveitamento dos resíduos de forma sustentável, apresentando-se como fonte de inovação biotecnológica para a produção de lipídeos totais;
- ✓ Durante a curva de crescimento do *A. parasiticus* UCP 1182 foi possível verificar durante a produção de lipídeos, fase log até 72h e posteriormente fenômeno diauxia entre 96h a 120h voltando a fase exponencial até 144h. Não sendo constatada a fase de declínio e grandes variações no pH na produção tanto de biomassa quanto de lipídeos;
- ✓ Os substratos agroindustriais possibilitaram crescimento da amostra conforme o planejamento fatorial tendo uma boa produção de lipídeos totais acima de 20% da sua biomassa para todas amostras destacando o ensaio (8) com 48,9% de lipídeos totais.

- ✓ A caracterização dos ácidos graxos em meio Czapeck proporcionou a concentração de ácidos graxos insaturados com a presença do linoleico e oleico, sugerindo um bom resultado para estudos posteriores na produção de biodiesel.
- ✓ A produção em meio alternativo melaço de cana-de-açúcar e milhocina, favoreceu o aparecimento de ácidos graxos como o linonênico C:18:3 α -3, mostrando viável para a indústria farmacêutica e alimentícia.
- ✓ O *A. parasiticus* UCP 1182 , mostrou-se com capacidade antioxidante inibindo a oxidação do substrato quando aumentadas as concentrações do extrato; demonstrando que em 4,0677 μ g/ mL da concentração do extrato lipídico, possui ação antioxidante, podendo ser melhor estudada em estudos posteriores.

ANEXOS



ISSN: 1984-3151

MODELO DE ARTIGO DA REVISTA E-XACTA

TEMPLATE FOR REVISTA E-XACTA

Magali Maria de Araújo Barroso¹; Autor²; Autor³

- 1 Doutora em Ciências em Engenharia de Sistemas e Computação. COPPE/UFRJ, 1987. Professora do Centro Universitário de Belo Horizonte - UniBH. Belo Horizonte, MG. magali.barroso@prof.unibh.br.
- 2 Titulação máxima. Instituição de formação, Ano. Função e Afiliação Institucional. Cidade, Unidade Federativa. E-mail.
- 3 Titulação máxima. Instituição de formação, Ano. Função e Afiliação Institucional. Cidade, Unidade Federativa. E-mail.

Recebido em: XX/XX/XXXX - Aprovado em: XX/XX/XXXX - Disponibilizado em: XX/XX/XXXX

*RESUMO: Estabelece o modelo de formatação dos artigos a serem submetidos à **Revista e-xacta**, publicada pelo Centro Universitário de Belo Horizonte - UniBH.*

PALAVRAS-CHAVE: Artigo. Formatação. Revista e-xacta.

*ABSTRACT: It establishes the formatting template for the papers to be submitted to **Revista e-xacta**, which is published by UniBH.*

KEYWORDS: Article. Formatting. Revista e-xacta.

1 INTRODUÇÃO

A **e-xacta** é a revista eletrônica do UniBH, registrada no Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia (IBICT) com o ISSN: 1984-3151. O ISSN (*International Standard Serial Number*) é o Número Internacional Normalizado para Publicações Seriadas, conforme (IBICT, 2012). A Revista **e-xacta**, criada em 2008, tem como objetivo divulgar trabalhos relativos às Ciências Exatas e Tecnologia.

O público-alvo deste periódico é composto pela comunidade acadêmica universitária, profissionais das áreas mencionadas ou que delas se servem no

exercício de sua atividade fim, além de organizações públicas, privadas e do terceiro setor; todos atentos à incorporação do conhecimento científico-tecnológico como uma das bases do desenvolvimento social e econômico.

A periodicidade da revista é semestral (julho e dezembro) com edições especiais temáticas, publicadas esporadicamente. A revista utiliza o software livre SEER - Sistema Eletrônico de Editoração de Revistas, desenvolvido pelo IBICT, para construção e gestão de publicações periódicas eletrônicas. Todo o seu acervo tem livre acesso,

disponibilizado pelo *site*:
www.unibh.br/revistas/exacta/.

As seções da revista, com exceção do Editorial, estão abertas à submissão de trabalhos e participam do processo de avaliação pelos pares no sistema de avaliação anônima (*double blind review*), por pelo menos dois pareceristas.

Os artigos submetidos devem atender aos objetivos da **Revista e-xacta**, serem inéditos, teóricos ou aplicados às diversas áreas do conhecimento. E realizados em universidades, centros de pesquisa e organizações nacionais ou internacionais, a partir de atividades de ensino, pesquisa ou extensão.

Os interessados em enviar contribuições à revista devem acessar o *site* www.unibh.br/revistas/exacta/ e seguir as instruções contidas nas Normas Editoriais disponíveis na aba Sobre. As submissões são *online* e além do envio do artigo, seguindo o modelo apresentado na edição Atual da revista, os autores devem preencher os metadados. Tratam-se de informações importantes sobre cada um dos autores e da área temática abordada no conteúdo do trabalho científico. Esclarecimentos de dúvidas e informações adicionais podem ser obtidos pelo e-mail: exacta@unibh.br.

As seções subsequentes deste documento se compõem das normas de formatação a serem adotadas, bem como a estruturação básica de um artigo científico. São estabelecidas as formas de inclusão de objetos ilustrativos, necessários para enriquecer e facilitar o entendimento do texto, e esclarecem a necessidade da inserção das citações, bem como a forma em que as mesmas devem ser apresentadas. Além disso, o texto explicita, conforme as normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), o formato das referências de documentos frequentemente consultados, cujas informações podem ser complementadas por França e Vasconcellos (2011). As últimas seções descrevem os

procedimentos utilizados para a avaliação dos artigos e para a publicação da revista.

2 NORMAS PARA FORMATAÇÃO

A formatação dos artigos submetidos deve obedecer às diretrizes estabelecidas neste documento, que seguem a padronização da ABNT – NBR 6022 (2003) e NBR 14724 (2005). Aconselha-se ao autor a utilização deste modelo para editar o artigo. As informações sobre a autoria (Nome do autor, Titulação máxima. Instituição de formação, Ano. Função e Afiliação Institucional. Cidade, Unidade Federativa. E-mail) serão excluídas, pela Comissão Editorial, durante o processo de avaliação.

O artigo deve estar salvo no formato Microsoft Word (.doc) contendo de 6 a 20 páginas. A linguagem deve ser clara, gramaticalmente correta e na terceira pessoa do singular.

O alinhamento do texto deve ter formatação justificada, sem cabeçalho, rodapé, notas de pé de página, nem número da página. O formato do papel deve ser A4, com margens superior e inferior de 2,5 cm e margens laterais de 1,5 cm. A fonte do documento é Arial, o tamanho e estilo da fonte dependem da seção em que o texto se insere. Os parágrafos não possuem recuo, têm espaçamento anterior de 0 pt. e, posterior, de 6 pt.. O espaçamento entre linhas é de 1,5, salvo em casos particulares, explicitados na sequência do texto.

Em um artigo científico destacam-se três elementos:

1. Pré-textuais;
2. Textuais;
3. Pós-textuais.

Optou-se por apresentar esses elementos com enumeração de tópicos para que se esclareça tal formatação. Observe-se que os tópicos são separados por ponto-e-vírgula e o último finalizado com ponto. O

afastamento dos marcadores é de 0,75 e o texto de 1,25.

2.1 ELEMENTOS PRÉ-TEXTUAIS

O primeiro elemento do artigo é o título. É expresso em Português e em Inglês, deve ser breve e inspirado no objetivo geral do trabalho, refletindo o conteúdo do texto. Em títulos não se coloca ponto final. Se houver subtítulo, este deve ser separado do título por dois pontos (:). Essas informações ocupam as linhas iniciais do documento, ao lado da logomarca da revista. Devem estar centralizadas, em negrito e efeito Versalete. O título em português possui tamanho da fonte 16 e, o em inglês, 14.

Há uma linha em branco de 12 pontos entre o título e as informações sobre os autores, com espaçamento entre linhas de 1,5. Os nomes em negrito, centralizados e fonte 12, separados por ponto-e-vírgula e identificados, posteriormente, por sobrescritos em algarismos arábicos. Na sequência, para cada autor, devem-se apresentar as seguintes informações em fonte de tamanho 8: Titulação máxima. Instituição de formação, Ano. Função e Afiliação Institucional. Cidade, Unidade Federativa. E-mail.

Observe-se que uma linha em branco deve separar os dados supracitados da seção seguinte.

O Resumo e as Palavras-chave, editados na margem esquerda, seguidos de dois pontos, são formatados em itálico, fonte de tamanho 10 e espaçamento simples entre linhas. Nos títulos destas seções usa-se o efeito Versalete. Conforme esclarece a ABNT NBR 6028 (2003), é aconselhável que o resumo contenha no máximo 250 palavras e seja editado em um único parágrafo, no qual se ressaltem o objetivo, o método, os resultados e a conclusão do artigo. Ele deve ser expresso na voz ativa, na terceira pessoa do singular. Composto por frases concisas e afirmativas. Devem-

se evitar a enumeração de tópicos e a inserção de símbolos e ilustrações. Na linha posterior são discriminadas de três a seis palavras-chave, que representam o conteúdo do documento, sendo utilizadas como chave de busca. São separadas entre si e finalizadas por ponto.

Após uma linha em branco, inserem-se o *Abstract* e *Keywords*, que são a versão em inglês das duas seções anteriores, com a mesma formatação.

2.2 ELEMENTOS TEXTUAIS

São compostos pela Introdução, Desenvolvimento e Conclusão.

Como pode ser observado, existem linhas em branco e um traço separando a última seção dos elementos pré-textuais para a Introdução, que é a primeira seção dos elementos textuais. A partir desse ponto o texto é formatado em duas colunas de 8,6 cm de largura e espaçamento entre colunas de 0,8 cm.

Na Introdução expõe-se o tema tratado, sua delimitação e foco de abordagem, contextualizando-o na literatura consultada. Apresentam-se o objetivo geral e, os específicos, conceituações, justificativa e motivação do estudo, um breve relato sobre o plano de desenvolvimento, enfim, os pressupostos necessários à sua compreensão. No último parágrafo da Introdução deve constar uma descrição sintética, ou seja, a sinopse do conteúdo abordado nas seções subsequentes do artigo.

O Desenvolvimento é o elemento textual central, a parte principal do artigo. É ele que dá a visão pormenorizada do tema estudado. Pode ser exposto em várias seções tais como: a revisão bibliográfica, o marco teórico que fundamenta a metodologia utilizada, o conjunto de técnicas e processos da pesquisa, a coleta de dados e sua quantificação, se for o caso, além da apresentação e discussão dos resultados.

Apresenta-se na última seção, a Conclusão, a síntese do que foi estudado, onde se devem evidenciar os aspectos essenciais da pesquisa, relacionar os resultados obtidos com os objetivos propostos, expor as dificuldades encontradas, recomendar, se conveniente, novas abordagens para o tema e sua extensão em estudos futuros.

Quanto à formatação, os títulos das seções e subseções, com alinhamento à esquerda, são destacados do texto por uma linha em branco, anterior. Devem ser numerados com algarismos arábicos e com apenas um espaço entre o algarismo e o título, conforme a norma ABNT NBR 6024 (2003). Todos os títulos possuem fonte 12, com efeito Versalete e em negrito. Para facilitar, cada vez que se abrir uma nova seção, copie e cole o título da anterior para depois editá-lo.

As seções podem ter subseções e estas ainda comportam mais três níveis de subdivisões. Como exemplo: **4.2.3 METODOLOGIA** designa a terceira subdivisão da segunda subseção da seção 4.

O autor deve estar atento ao uso de siglas. Na primeira utilização de uma sigla, deve-se informar o seu significado. Na primeira seção deste documento foi mencionada a Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT – e, posteriormente foi usada simplesmente a sigla ABNT, já que era conhecido o seu significado. Outra observação importante é que palavras em outros idiomas devem vir em itálico.

Em relação à formatação do artigo, deve-se cuidar para que o título de uma seção ou subseção não ocupe a última linha de uma coluna. Neste caso, linhas em branco são providenciais para que o mesmo ocupe a primeira linha da coluna seguinte.

2.3 ELEMENTOS PÓS-TEXTUAIS

Os Elementos Pós-Textuais não são numerados e se compõem de: Agradecimentos (opcional), Referências, Apêndices (opcional) e Anexos (opcional).

As referências são obrigatórias em um texto científico. A seção 5 deste modelo contém informações mais detalhadas sobre as referências.

Os apêndices e anexos, conforme consta na ABNT NBR 6022 (2003), são textos ou documentos que ilustram, comprovam, fundamentam ou completam a argumentação do trabalho desenvolvido. A diferença entre eles é que os apêndices são de autoria do próprio autor do artigo e, os anexos, de autoria de terceiros. Para identificá-los, utilizam-se letras maiúsculas consecutivas, seguidas de travessão e do título. Somente as palavras Apêndice e Anexo em caixa alta. As letras de identificação e os títulos devem estar em fonte tamanho 12, em negrito e efeito Versalete, como nos exemplos: **APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO** ou **ANEXO D – MAPA DA REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE.**

3 COMO TRATAR AS ILUSTRAÇÕES

As ilustrações (desenhos, esquemas, figuras, fluxogramas, fotografias, gráficos, mapas, organogramas, plantas arquitetônicas, quadros, entre outras), as equações, as fórmulas, as tabelas e os algoritmos são utilizados com o objetivo de explicar e facilitar o entendimento do texto.

Tais elementos devem ser referenciados no texto e, conforme ensinam França e Vasconcellos (2011), eles devem estar tão próximos quanto possível da primeira vez que forem mencionados. Devem ter numeração sequencial, em separado para cada categoria, seguidos do título e espaçamento simples entre linhas. Devem-se evitar dividir tabelas, algoritmos, quadros, etc. Caso tenham sido extraídos de um documento, já

publicado, é obrigatória a indicação do mesmo, logo abaixo do título, deve-se inserir: Fonte – SOBRENOME-DO-AUTOR, ano, p. número-da-página. Antes e após a ilustração deve-se deixar uma linha em branco para destacá-la do texto.

3.1 FIGURAS

As figuras devem ser incluídas e referenciadas como a FIG. 1.



Figura 1 – Logo da **Revista e-xacta** do Centro Universitário de Belo Horizonte
Fonte - GUIMARÃES, 2008, p.3.

Observe-se que o título da figura e, se for o caso, a fonte bibliográfica de onde foi extraída são centralizados e estão inseridos posteriormente à mesma.

3.2 ALGORITMOS

Devem ser formatados como o Algoritmo 1, dado a seguir, com título e espaçamento simples entre linhas.

Algoritmo 1 – Determina e imprime o menor entre dois números distintos.

Algoritmo

declare A,B, Menor numérico

leia A,B

se A < B

então Menor ← A

senão Menor ← B

fim se

imprima Menor

fim algoritmo.

3.3 EQUAÇÕES E FÓRMULAS

Equações e fórmulas devem ser numeradas e citadas no texto conforme a Eq. 1:

$$f = \frac{c}{\lambda} \quad (1)$$

onde: f = frequência [Hz], c = velocidade da luz no vácuo = 3.10^8 [m/s], λ = comprimento de onda [m].

3.4 TABELAS

As tabelas são formatadas segundo a TAB. 1. Observe-se que a numeração e os títulos das tabelas são centralizados e colocados antes das mesmas.

Tabela 1

Parâmetros montagem das Medições

Medição	f	h_r
1	200MHz	75 cm
2	400MHz	33,33 cm
3	900MHz	16,67 cm
4	1800MHz	8,33 cm

Fonte - GUIMARÃES, 2008, p.2.

4 A IMPRESCINDIBILIDADE DAS CITAÇÕES

Como esclarecem França e Vasconcellos (2011): “A fonte de onde foi extraída a informação deve ser citada obrigatoriamente, respeitando desta forma os direitos autorais.” É, portanto, imprescindível que o autor cite as fontes bibliográficas que nortearam suas ideias no desenvolvimento do trabalho. São elas que dão credibilidade à argumentação, ao emprego da metodologia utilizada para a obtenção dos resultados da pesquisa.

As citações podem ser diretas ou indiretas, como determina a norma ABNT NBR 10520 (2002). As

citações diretas são transcritas como aparecem no texto original. Se possuírem até três linhas são editadas no corpo do texto, entre aspas. Observe-se a citação apresentada na parte inicial desta seção. Aquelas que excedem este valor são destacadas como a que se encontra a seguir.

As citações longas, com mais de três linhas, devem constituir um parágrafo independente, com recuo de 1,25, fonte de tamanho 9 e espaçamento simples entre linhas. As aspas são desnecessárias, já que a formatação diferenciada induz tratar-se de uma citação direta. Ao final deve-se colocar entre parênteses o sobrenome do autor em caixa alta, seguido de vírgula, o ano de publicação e, se possível, o número da página. (SOBRENOME-DO-AUTOR, ano, p. X).

As citações indiretas são livres, isto é, reproduzem as ideias do autor consultado com outras palavras, como consta em (MICHEL, 2005, p.127).

As normas da ABNT estabelecem formas diferentes para a indicação dos autores nas citações, como podem ser vistas em França e Vasconcellos (2011) ou (FRANÇA; VASCONCELLOS, 2011).

Observe-se que as duas citações do parágrafo anterior são apresentadas de maneiras diferentes. A primeira com apenas o ano entre parênteses e, nesse caso, os sobrenomes dos autores, com as letras iniciais maiúsculas, são separados por vírgulas e a conjunção aditiva “e”. Na segunda, todos os sobrenomes dos autores são editados em caixa alta, separados por ponto-e-vírgula, sendo o último seguido de vírgula e o ano de publicação. Pode-se inserir após o ano, a página de onde foi extraída a informação citada. Caso o documento possua mais de três autores, deve-se indicar na citação, como também em seu registro nas Referências, o sobrenome do primeiro autor acompanhado da expressão latina *et al.*, em itálico, seguida de vírgula e o ano de publicação. Como o exemplo a seguir: Sobrenome-do-primeiro-autor *et al.* (ano) ou (SOBRENOME-DO-PRIMEIRO-AUTOR *et al.*, ano).

5 NORMAS PARA AS REFERÊNCIAS

As referências, separadas por um traço das seções anteriores, são apresentadas ao final do artigo. Elas são obrigatórias em um artigo científico e devem ser composta pelas fontes efetivamente consultadas. Além disso, todo documento pertencente às referências deve ser citado no texto e vice-versa, toda citação deve ter seu documento fonte presente nas referências.

A lista dos títulos bibliográficos deve estar em ordem alfabética usando o sobrenome dos autores como primeiro parâmetro e, como segundo, o título da publicação. A transcrição dos elementos que compõem as referências deve estar de acordo com as normas da ABNT, especificadas em (FRANÇA; VASCONCELLOS, 2011).

A norma ABNT NBR 6023 (2002) define que as referências devem ser alinhadas à margem esquerda do texto, editadas com espaçamento simples entre linhas, sem afastamento anterior e posterior entre parágrafos. Para destacá-las, elas são separadas por uma linha em branco.

O formato das referências depende do tipo de documento consultado, sendo os principais apresentados nas subseções dadas a seguir, cujas informações, em sua maioria, foram extraídas de (FRANÇA; VASCONCELLOS, 2011). Alguns códigos devem ser observados. Quando estiver escrito:

- AUTOR – Deve-se escrever o Sobrenome do primeiro autor em caixa alta, seguido de vírgula, e demais nomes deste autor, apenas com as primeiras letras em caixa alta ou as iniciais seguidas de ponto e um espaço entre elas. Caso haja de dois a três autores, coloca-se entre eles um ponto e vírgula e repete-se a formatação apresentada para cada um deles. Se houver mais de três autores coloca-se apenas as informações

sobre o primeiro e em seguida, em itálico, a expressão latina *et al.*

- *Informação* – deve-se colocar a informação em itálico.
- Informação – Deve-se colocar a informação com a fonte em estilo normal.
- (Informação) – Deve-se colocar a informação entre parênteses.
- <Informação> - Deve-se apresentar a informação entre os símbolos <>.
- Informação. – Deve-se colocar após a informação um ponto final.
- Cidade: Editora, Ano. – Deve-se colocar a cidade na qual o documento foi publicado, seguida de dois pontos, a editora, seguida de vírgula e o ano de publicação, seguido de ponto final.
- Edição – Deve-se indicar o número da edição do livro, seguida de ponto e depois de um espaço coloca-se ed., a abreviatura de edição.
- Acesso em: 25 dez. 2000. Indica a data em que um documento *online* foi acessado. A expressão Acesso em, seguida de dois pontos, um espaço. o dia da consulta, mais um espaço, seguido da abreviatura do mês e depois de um espaço o ano, seguido de ponto. As abreviaturas dos meses são: jan., fev., mar., abr., maio, jun., jul., ago., set., out., nov. e dez.

5.1 LIVROS

Impresso

AUTOR. *Título*: subtítulo. Edição. Cidade: Editora, Ano. Número de páginas p. ISBN número do ISBN.

Eletrônico

AUTOR. *Título*: subtítulo. Edição. Cidade: Editora, Ano. (disquete, ou CD-ROM) ou Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano. ISBN número do ISBN.

5.2 CAPÍTULO DE LIVRO

Impresso

AUTOR DO CAPÍTULO. Título do capítulo. In: AUTOR DO LIVRO. *Título*: subtítulo do livro. Edição. Cidade: Editora, Ano. Capítulo n.º do capítulo. página inicial – página final do capítulo. ISBN número do ISBN.

Eletrônico

AUTOR DO CAPÍTULO. Título do capítulo. In: AUTOR DO LIVRO. *Título*: subtítulo do livro. Edição. Cidade: Editora, Ano. (disquete, ou CD-ROM) ou Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano. ISBN número do ISBN.

5.3 ARTIGO DE PERIÓDICO

Impresso

AUTOR DO ARTIGO. Título do artigo. *Título do periódico*, Cidade, v. número do volume, n. número do fascículo, página inicial – página final, abreviatura do mês Ano. ISSN número do ISSN do periódico.

Eletrônico

AUTOR DO ARTIGO. Título do artigo. *Título do periódico*, Cidade, v. número do volume, n. número do fascículo, página inicial – página final, abreviatura do mês Ano. Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano. ISSN número do ISSN do periódico.

5.4 ARTIGO DE JORNAL

Impresso

AUTOR DO ARTIGO. Título do artigo. *Título do jornal*, Cidade, dia, abreviatura do mês Ano. Número ou Título do caderno, seção ou suplemento, página inicial – página final.

Eletrônico

AUTOR DO ARTIGO. Título do artigo. *Título do jornal*, Cidade, dia, abreviatura do mês Ano. Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano.

5.5 TRABALHOS ACADÊMICOS – MONOGRAFIAS, DISSERTAÇÕES E TESES

Impresso

AUTOR. *Título*: subtítulo. Ano de apresentação. Número de folhas f. Categoria do Trabalho Acadêmico

(Área de Concentração) – Nome da Escola ou Instituto, Nome da Instituição Universitária, Cidade, Ano da defesa.

Eletrônico

AUTOR. *Título:* subtítulo. Ano de apresentação. Número de folhas f. Categoria do Trabalho Acadêmico (Área de Concentração) – Nome da Escola ou Instituto, Nome da Instituição Universitária, Cidade, Ano da defesa. (CD-ROM ou disquete) ou Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano.

5.6 TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

Impresso

AUTOR DO TRABALHO. *Título:* subtítulo. In: NOME DO EVENTO, número, ano, cidade de realização. *Título da publicação:* subtítulo. Ano de apresentação. Cidade da publicação: Editora, Ano. Página inicial – página final do trabalho.

Eletrônico

AUTOR DO TRABALHO. *Título:* subtítulo. In: NOME DO EVENTO, número, ano, cidade de realização. *Título da publicação:* subtítulo. Ano de apresentação. Cidade da publicação: Editora, Ano. Página inicial – página final do trabalho. (CR-ROM ou disquete) ou Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano.

5.7 SITES

NOME DO SITE. *Título do serviço ou produto.* Cidade: Entidade, Ano. Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano.

5.8 LEIS E RESOLUÇÕES

NOME DO PAÍS, ESTADO MUNICÍPIO OU NOME DA ENTIDADE. Órgão. *Título.* Tipo de documento, Numeração. Dia de mês de ano. Elementos Complementares que identificam o documento. Dados de publicação do documento. Cidade, data.

6 PROCESSO DE AVALIAÇÃO DO ARTIGO

Após a submissão do artigo, inicia-se o processo de avaliação, que utiliza o sistema de revisão anônima

por pelo menos dois pareceristas ou *double blind review*. É criada uma versão do arquivo em formato PDF (*Portable Document Format*), do qual se extraem as informações que identificam sua autoria. Em seguida o artigo é enviado a dois pareceristas. Caso os pareceres sejam conflitantes, um terceiro revisor é acionado para que a Comissão Editorial tenha o aval duplo de aceitação ou rejeição. Os pareceres quando recebidos são, também, formatados em PDF e enviados aos autores, sem a identificação de quem emitiu o parecer.

Sendo o artigo aceito para a publicação com restrição, os autores devem acatar as recomendações dos pareceristas e providenciarem o envio da nova versão do artigo.

Após a correção, a Comissão Editorial insere o nome do autor, enumera as páginas e demais dados pertinentes ao periódico, contendo informações sobre a edição da revista (volume, número, páginas etc.).

Deve-se ressaltar que o artigo (originalidade, autoria, conteúdo abordado etc.) é de inteira responsabilidade do autor, assim como a apresentação do texto no padrão culto da língua. A Comissão Editorial se dá o direito de alterar a formatação e a linguagem do texto para ajustá-las ao padrão da revista.

7 PUBLICAÇÃO

A última etapa do processo editorial é a publicação da revista. A nova edição é disponibilizada com o Sumário, que elenca os títulos dos artigos, os respectivos autores e o link para o Resumo. Ao acessar o Resumo, o usuário pode baixar o artigo completo no formato PDF.

AGRADECIMENTOS

A autora agradece ao Diretor, aos Coordenadores e Professores dos cursos do Instituto de Engenharia e

Tecnologia e à Administração Superior do UniBH pela confiança e apoio.

Agradece, especialmente, ao Prof. Cayley Guimarães, editor pioneiro da e-xacta, e aos editores das demais revistas eletrônicas do UniBH: Ana Sofia Sauma

(e-civitas), Luciene dos Santos (e-com), Ana Cristina Pereira Lage (e-hum) e Thiago Teixeira Mendes (e-scientia), companheiros de objetivo e trabalho.

REFERÊNCIAS

ABNT - NBR 6022: **Informação e documentação – Artigo em publicação periódica científica impressa - Apresentação.** Rio de Janeiro, maio 2003. 5 p.

ABNT - NBR 6023: **Informação e documentação - Referências – Elaboração.** Rio de Janeiro, ago. 2002. 24 p.

ABNT - NBR 6024: **Informação e documentação - Numeração progressiva das seções de um documento escrito - Apresentação.** Rio de Janeiro, maio 2003. 3p.

ABNT - NBR 6028: **Informação e documentação - Resumo - Apresentação.** Rio de Janeiro, nov. 2003. 2 p.

ABNT - NBR 10520: **Informação e documentação - Citações em documentos – Apresentação.** Rio de Janeiro, ago. 2002. 7 p.

ABNT - NBR 14724: **Informação e documentação - Trabalhos Acadêmicos - Apresentação.** Rio de Janeiro, maio 2005. 9 p.

FRANÇA, J. L.; VASCONCELLOS, A. C.; **Manual para Normalização de Publicações Técnico-Científicas.** 8.^a ed. rev. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 2011. 358 p. ISBN: 978-85-7041-560-8.

GUIMARÃES, C. ModeloexactaWord. **Revista e-xacta.** Belo Horizonte, Uni-BH, 2008. 3 p.

IBICT – Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia. Centro Brasileiro do ISSN. **Sobre o ISSN.** Brasília,DF: IBICT, 2012. Disponível em <http://www.ibict.br/informacao-para-ciencia-tecnologia-e-inovacao%20centro-brasileiro-do-issn>. Acesso em: 11 abr. 2012.

MICHEL, M. H. **Metodologia de Pesquisa Científica em Ciências Sociais.** São Paulo: Editora Atlas S.A., 2005. 141 p. ISBN: 85-224-4053-0

INSTRUÇÕES AOS AUTORES- REVISTA QUÍMICA NOVA

1. GERAL

Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos em Português, Inglês e Espanhol, que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc, além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico. Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

Artigos Originais: refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo as seções Introdução, Parte Experimental, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas e outros elementos.

Artigos sobre Educação: trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de graduação em Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, e outros elementos.

Notas Técnicas: trabalhos de comunicação de métodos, técnicas, aparelhagens ou acessórios desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito, desde que apresentem acentuado conteúdo químico. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo as seções Introdução, Parte Experimental, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc.

Assuntos Gerais: abordagem de assuntos de interesse geral dos químicos, tais como política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química, etc. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas e outros elementos.

Artigos de Revisão: destinados à apresentação do progresso em uma área específica de Química, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do especialista altamente qualificado e experiente. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas e outros elementos. Para submeter um artigo de Revisão, é imprescindível que o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação na referida área. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, para quimicanova@sbq.org.br, um resumo da revisão pretendida, acompanhado de uma carta explicativa da pertinência do trabalho e lista de publicações do autor na área em que pretende publicar. O material será analisado pelos Editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor o envio do manuscrito completo, dentro das normas de QN, e só então será dado início ao processo de avaliação pelos assessores. O aceite da submissão não garante a publicação do manuscrito, que passará pelo processo formal de avaliação equivalente ao das outras modalidades.

2. ANTES DA SUBMISSÃO

1.1 Direitos autorais

Ao submeter um manuscrito à revista Química Nova, assume-se que ele não foi publicado previamente, que não está sob processo de avaliação por outra entidade e que não será publicado simultaneamente em outro veículo de divulgação, no mesmo formato, sem a permissão por escrito dos Editores. Além disso, subentende-se que o autor responsável pela submissão tem o consentimento de todos os outros autores. Os autores também concordam que

os direitos autorais do manuscrito serão transferidos para a Sociedade Brasileira de Química (SBQ), caso o manuscrito seja aceito para publicação. Manuscritos aceitos e ilustrações se tornarão propriedades da SBQ.

1.2 Organização do manuscrito

Os manuscritos deverão apresentar clareza e concisão. A seção Introdução deverá identificar de forma clara e breve, utilizando-se de referências relevantes, a natureza do problema sob investigação e o conhecimento prévio a respeito dele. Revisões extensas da literatura não serão aceitas. A seção Parte Experimental pode preceder ou vir após a seção Resultados e Discussão, mas devem ser necessariamente separadas. A seção Conclusões, que resumirá brevemente as principais conclusões do trabalho, deverá ser disposta logo após a seção Resultados e Discussão. A parte experimental do manuscrito deve descrever os experimentos de maneira suficientemente detalhada para que outros pesquisadores possam reproduzi-los. O grau de pureza dos materiais utilizados deve ser fornecido, bem como todas as quantidades utilizadas. A descrição de procedimentos já estabelecidos não é necessária.

A instrumentação utilizada só deve ser descrita caso não seja padrão. Deve-se referir a instrumentos disponíveis comercialmente a partir de suas marcas e modelos. Todos os compostos novos devem ser completamente caracterizados, incluindo dados espectroscópicos e análises elementares. Espectros de massas de alta resolução poderão substituir análises elementares caso sejam acompanhados de provas inquestionáveis da pureza da amostra (pontos de fusão, cópias dos espectros RMN, etc.). Para compostos sintetizados em formas enantiomericamente puras ou enantiomericamente enriquecidas, sua rotação específica deverá ser fornecida. Nos casos em que o excesso enantiomérico for determinado por técnicas cromatográficas e/ou espectroscópicas, as cópias dos cromatogramas e/ou espectros devem ser inclusas no Material Suplementar (ver seção Material Suplementar).

Muitas publicações de Química Teórica e/ou Computacional utilizam rotinas baseadas em métodos bem documentados, sejam semi-empíricos ou *ab initio*. Neste caso é suficiente citar a variante utilizada, referindo-se a publicações importantes nas quais os métodos foram desenvolvidos, e o programa de computador utilizado, indicando brevemente as modificações realizadas pelo autor.

É de responsabilidade dos autores a obtenção de permissões para reprodução de gráficos e imagens retiradas de outros periódicos. Essas permissões para reprodução devem ser enviadas no momento da submissão, juntamente com os outros arquivos do manuscrito. A reprodução deve também ser informada nas respectivas legendas. Os manuscritos em língua inglesa que forem considerados para avaliação deverão portar certificado de correção de idioma emitido por empresa especializada. O certificado deve ser enviado através da plataforma ScholarOne no momento da submissão da versão revisada do manuscrito.

Geral

Deve-se utilizar a fonte Times New Roman, tamanho de 12 pt e cor preta. O espaçamento entre linhas deve ser de 1,5×. As páginas devem ser numeradas consecutivamente, no canto inferior direito. As linhas e os títulos e subtítulos das seções não devem ser enumerados. Os títulos das seções devem ser escritos em negrito e caixa alta, os subtítulos apenas em negrito e os subsubtítulos apenas em itálico.

A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho, ambos em inglês, com no máximo 200 (duzentas) palavras, e a indicação de 3 a 5 palavras-chave (keywords), também em inglês. O texto deve se iniciar a partir da terceira página do manuscrito.

Ao longo do texto, o autor deve se atentar às seguintes regras:

- Palavras em língua estrangeira (inglês, francês, latim, etc.) deverão ser escritas em itálico.
- Nomes científicos de espécies devem ser escritos em itálico, com a primeira letra do nome em caixa alta.

Alguns exemplos:

... os experimentos foram realizados *in situ*;

A bactéria *Escherichia coli*...;

O tratamento dos dados foi realizado a partir do software Origin;

- Todas as unidades devem ser separadas dos valores por um espaço simples (inclusive o grau Celsius). A mesma regra é válida para o caso de unidades em sequência.

Alguns exemplos:

10 °C;

15 mg L⁻¹ (evitar mg/L);

10 m s⁻² (evitar m/s²);

Atenção: Toda a nomenclatura utilizada deverá ser consistente, clara e de acordo com as regras estabelecidas por entidades apropriadas, como IUPAC, International Union of Biochemistry, Abstracts Service, Nomenclature Committee of the American Chemical Society, entre outras. Símbolos e unidades deverão seguir as recomendações da IUPAC. Os autores devem evitar o uso de unidades que não fazem parte do SI.

Detalhes

A primeira página deverá conter o graphical abstract (ver seção Graphical Abstract), título do trabalho, em negrito e caixa alta, nome dos autores em negrito e endereço. Se o endereço onde o trabalho foi conduzido é diferente do endereço atual de qualquer um dos autores, uma nota de rodapé indicando a posição atual pode ser incluída. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão ser listados em sequência e indicados utilizando-se letras sequenciais.

entre outras. Símbolos e unidades deverão seguir as recomendações da IUPAC. Os autores devem evitar o uso de unidades que não fazem parte do SI.

Normas para elementos gráficos e tabelas

Gráficos e Figuras: textos, nomes dos eixos e quaisquer outros elementos textuais que acompanham os elementos gráficos devem ser consistentes ao longo de todo o trabalho em relação à fonte, ao tamanho da fonte, ao espaçamento e à cor. Para elementos gerados por computador, deve-se evitar planos de fundo ou sombreamento.

Fórmulas estruturais e equações químicas: todas as estruturas químicas ou equações devem ser escritas utilizando a mesma fonte ao longo do manuscrito.

Equações: as equações devem ser escritas utilizando-se um editor de equações (MathType, Equation, entre outros) e devem ser numeradas sequencialmente ao longo do manuscrito.

Fotografias: As fotografias devem apresentar contraste e não devem ser montagens. Caso haja necessidade de uma escala, ela deve ser desenhada sobre a figura e não abaixo. Não serão aceitas fotografias de equipamentos comerciais.

Tabelas: as tabelas devem ser formatadas de modo a fornecer informações diretas ao leitor. Sombreamentos e negritos devem ser evitados. Qualquer informação extra deve vir abaixo da tabela, na forma de nota de rodapé, utilizando-se as letras a, b, c e assim por diante.

Graphical abstract (em inglês): O graphical abstract deve resumir o conteúdo do trabalho de forma concisa e dedicada a capturar a atenção de um público amplo. O autor deve apresentar uma figura nova, usando como parâmetro uma estrutura chave, uma reação, uma equação, um conceito, um gráfico, um teorema, entre outras possibilidades. Recomenda-se que seja de caráter artístico e possua cores diversas. Não serão aceitas fotos de equipamentos comerciais. Atenção: a imagem deve possuir alta resolução (em formato .tiff, .jpg ou qualquer outro de ampla utilização que possa ser editado) e tamanho de 4 cm de altura por 8 cm de largura [os elementos textuais devem ser legíveis nessas dimensões]. Junto com o graphical abstract, o autor deverá enviar um texto explicativo em inglês (em arquivo .txt, .rtf ou .doc) de, no máximo, 3 linhas.

Normas para citações e lista de referências

Os elementos gráficos e as tabelas devem ser numeradas e citadas no texto, utilizando-se a primeira letra em caixa alta. Não se deve abreviar as citações.

Alguns exemplos:

... como pode ser verificado na Tabela 1.

A Figura 3 mostra o sistema utilizado...

(Tab. 1, Fig. 1 e quaisquer outras abreviações dos títulos dos elementos não devem ser utilizadas)

As citações de referências devem ser feitas de forma consecutiva, na forma numérica sobrescrita (sem parênteses ou colchetes), sempre após a pontuação, quando houver. Citações de duas ou mais referências devem ser separadas por vírgulas. Citações de três ou mais referências consecutivas devem ser agrupadas, utilizando-se o hífen (-). Não utilizar espaços entre as citações ou entre a citação e o caractere sobre o qual está posicionada.

Alguns exemplos:

Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura.^{3,7,8}

Existe extensa literatura a respeito do sistema utilizado,⁹⁻¹² bem como das propriedades dos materiais empregados.¹³

salicilato de sódio,¹⁻³

Nishide et al.,⁴

... pela redução do ácido crômico,^{4-8,12}

(Três ou mais referências consecutivas devem ser citadas utilizando-se o hífen)

Na seção Referências, as abreviações dos títulos de periódicos devem estar de acordo com as definidas no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://cassi.cas.org>). Caso o

periódico não esteja listado no CASSI, o título deve ser escrito por extenso. As normas para o ano, o volume e as páginas seguem abaixo para diversos tipos de literaturas. A pontuação, os espaçamentos, os negritos e os itálicos devem ser verificados com atenção. Manuscritos com referências fora das normas da revista serão reenviados ao autor até que os erros sejam verificados e corrigidos.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; J. Indian Chem. Soc. 1990, 67, 518.

2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:

Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved.; Khim. Khim. Tekhnol. 1976,19, 708. (CA 85:78051s).

3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar DOI da seguinte maneira:

Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; Electrochimica Acta (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

4. É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:

Varela, H.; Torresi, R. M.; J. Electrochem. Soc. 2000, 147, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; J. Braz. Chem. Soc. 1996, 7, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; Quim. Nova 2001, 24, 473.
Patentes:

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; Jpn. Kokai Tokkyo Koho 79 73,771 1979.(CA 91:P193174v)

6. Kadin, S.B.; US pat. 4,730,004 1988. (CA 110:P23729y)

7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T.; Br PI 9.604.468-3,1999.

Livros:

com editor(es):

8. Regitz, M. Em Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

sem editor(es):

9. Cotton, F. A.; Wilkinson, G.; Advanced Inorganic Chemistry, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

Programas de computação (Softwares):

10. Sheldrick, G. M.; SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

Teses:

11. Velandia, J. R.; Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

Material apresentado em Congressos:

12. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; Resumos da 20a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

Páginas Internet:

<http://www.s bq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

Material não publicado:

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; J. Braz. Chem. Soc., no prelo.

Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; J. Braz. Chem.

Soc., submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.;

trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Manuscritos contendo RMN, IV, espectros de massas, etc.

Sempre que um composto é sintetizado ou identificado (novo ou conhecido previamente), é obrigatório o envio de todos os dados espectrais (dados e espectros) como Material Suplementar (ver seção Material Suplementar) no momento da submissão do manuscrito.

Material Suplementar

Esta modalidade foi criada para que o texto principal seja objetivo e contenha o número estritamente necessário de Figuras e Tabelas. O conteúdo do Material Suplementar (MS) deverá ser colocado no final do trabalho, após a seção REFERÊNCIAS. Quando houver MS, deve ser criada uma seção MATERIAL SUPLEMENTAR, logo após a seção CONCLUSÃO, com a descrição de seu conteúdo. O texto deve também indicar o acesso livre ao MS a partir do website da revista Química Nova (<http://quimicanova.s bq.org.br/>).

Elementos gráficos e Tabelas do Material Suplementar devem ser numeradas sequencialmente, com a letra S após a numeração. Ex: Figura 1S, Tabela 4S, etc.

Apesar de complementar a informação do manuscrito, o MS deve ser um documento completo. Caso sejam usadas referências, elas devem ser listadas ao final do próprio MS e numeradas na forma

1S, 2S, ...

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.

MODELO/ REVISTA QUÍMICA NOVA

A REAÇÃO DE METÁTESE DE OLEFINAS: REORGANIZAÇÃO E CICLIZAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS título: todas as letras maiúsculas

José A. Benício^a, Maria C. Cavalcante^b e João D. de Almeida^{a,*} marcar com asterisco o autor que submeteu o artigo

^aAqui vai o endereço. Lembre-se de que a menor unidade usada deve ser o departamento (não citar laboratório, grupo, etc), depois instituto (se houver), depois universidade. Sempre tudo por extenso. Exemplo: Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

^bCaso haja autores de outro instituto, separar os autores por endereço, como foi feito aqui. Nesse caso, aqui entra o endereço de Maria C. Cavalcante

-----marque uma alternativa, não apague o texto em azul-----

Manuscrito com material suplementar

Manuscrito sem material suplementar

*e-mail: insira aqui o email do autor que submeteu o artigo

THE OLEFIN METATHESIS REACTION: REORGANIZATION AND CICLIZATION OF ORGANIC COMPOUNDS título em inglês do seu manuscrito, com todas as letras maiúsculas e sem negrito

Aqui deve ser escrito o abstract do seu artigo, não se esqueça de que ele deve apresentar no máximo 200 palavras.

Keywords: keyword1; keyword2; keyword3. insira entre 3 e 5 keywords

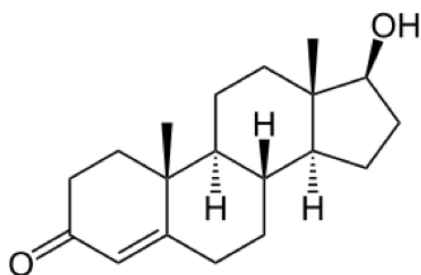
INTRODUÇÃO

Os títulos da seção são escritos com todas as letras maiúsculas e em negrito. Deve haver espaçamento antes e depois do título da seção.

Subtítulo1 subtítulo– Apenas a 1ª letra maiúscula, **em negrito**. Deve haver espaçamento antes e depois do subtítulo

Aqui entra o seu texto. Caso haja alguma citação a ser feita, ela deve seguir este padrão.¹ Caso queira citar um intervalo de três ou mais referências em sequência, use dessa forma.²⁻⁴ Quando forem apenas duas ou não estiverem em sequência, usar a vírgula.^{1,3,5} Repare que todas elas aparecem logo após a pontuação e não apresentam espaços.

Como pode perceber, os parágrafos não apresentam tabulações. Favor manter esse padrão durante todo o texto. Caso queira inserir uma figura, seguir o padrão como na Figura 1.



Testosterone (C₁₉H₂₈O₂)

Figura 1. *A descrição da figura deve ter esse formato. Em itálico e sem ponto final*

Todas as figuras devem ser incluídas no texto, logo após serem citadas pela primeira vez.

Tabelas também são indicadas como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Siga esse padrão. O título em negrito e a descrição do título sem negrito ou itálico.

Não colocar ponto final

Ao final do rodapé das tabelas: deve ter ponto final

Deve haver espaço entre número e unidade (por exemplo, 1 h) e as unidades devem ser abreviadas.

Termos ou expressões em inglês ou em latim – em itálico

Subtítulo2

Sub-subtítulo Sub-subtítulo de seção só a 1ª em maiúscula e em itálico. Deve haver espaçamento apenas antes do sub-subtítulo.

As figuras (incluindo gráficos, esquemas, etc) deverão ser em número máximo de 7 figuras e ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco). Para número maior, utilizar o Material Suplementar. A resolução mínima é de 300 dpi. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente, além de boa qualidade gráfica

Outro subtítulo do trabalho

Outro sub-subtítulo do trabalho

PARTE EXPERIMENTAL

Primeiro subtítulo da parte experimental

Primeiro sub-subtítulo da parte experimental

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiro subtítulo dos resultados e discussão

Primeiro sub-subtítulo dos resultados e discussão

CONCLUSÃO

MATERIAL SUPLEMENTAR

Quando houver material suplementar, ele deve ser indicado aqui, com a descrição do material, similar a: Algumas imagens dos sistemas utilizados neste trabalho estão disponíveis em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos vão aqui. Caso queira agradecer a uma pessoa, apenas o último sobrenome deve ser por extenso, por exemplo A. B. Cardoso.

REFERÊNCIAS

Artigo:

1. Tavares, L. C.; *Quim. Nova* **2004**, 27, 631.

Artigo de uma revista de difícil acesso – deve-se citar o número de Chemical Abstract

2. Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved.*; *Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, 19, 708. (CA 85:78051s).

Artigo com número de DOI, mas sem a referência completa:

3. Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

Patentes - na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses:

4. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 79 73,771 **1979**. (CA 91:P193174v)

5. Kadin, S.B.; *US pat.* 4,730,004 **1988**. (CA 110:P23729y)

6. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T. *Br PI* 9.604.468-3, **1999**.

Livro com editor(es):

7. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

Livro sem editor(es):

8. Cotton, F. A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

Programas de computação (Softwares):

9. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

Teses e dissertações:

10. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

Material apresentado em Congressos:

11. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

Páginas de Internet:

12. <http://www.sbjq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

Material não publicado:

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo.

Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Os resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

P.S.: os títulos dos periódicos devem ser abreviados. Antes da submissão do trabalho, por favor, confira se as abreviaturas estão corretas no website: <http://cassi.cas.org>. Caso a abreviatura autorizada de uma determinada revista não puder ser localizada com a ferramenta CASSI, deve-se citar o título completo.

Se a referência for livro, lembre-se de que é necessário indicar editora, cidade e ano de publicação.

MATERIAL SUPLEMENTAR

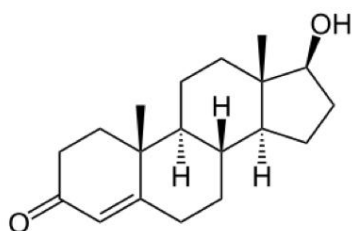
Caso seu manuscrito contenha material suplementar, escreva aqui, após as referências, o texto e também insira as figuras, tabelas e esquemas. Não esqueça que as legendas das figuras e títulos das tabelas se diferenciam das do texto principal por conter a letra S. Por exemplo:

Tabela 1S. Siga esse padrão. O título em negrito e a descrição do título sem negrito ou itálico.

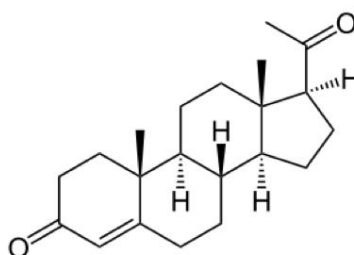
Não colocar ponto final

Ao final do rodapé das tabelas: deve ter ponto final.

Exemplo de figura:



Testosterone (C₁₉H₂₈O₂)



Progesterone (C₂₁H₃₀O₂)

Figura 1S. *A descrição da figura deve ter esse formato. Em itálico e sem ponto final*

Atenção: As figuras e tabelas devem ser inseridas no texto, como indicado neste template, mas também devem ser inseridos os arquivos originais separadamente na plataforma ScholarOne. Todas as figuras devem ter alta resolução. Figuras em baixa resolução causam atrasos na publicação de seu trabalho. Para mais detalhes, consultar as “Instruções para Autores” em nosso website.