



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

Miller da Costa Lima Batista e Silva

PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS E BIOMASSA POR MUCORALES (*Mucor subtilíssimus* UCP 1262, *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 e *Rhizopus microsporus* UCP 1304) ISOLADOS DO SOLO DA CAATINGA DE PERNAMBUCO

Recife
2017

Miller da Costa Lima Batista e Silva

PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS E BIOMASSA POR MUCORALES (*Mucor subtilíssimus* UCP 1262, *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 e *Rhizopus microsporus* UCP 1304) ISOLADOS DO SOLO DA CAATINGA DE PERNAMBUCO

Dissertação apresentada, ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais, da 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

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

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva

**Recife
2017**

S586p

Silva, Miller da Costa Lima Batista e

Produção de lipídeos e biomassa por mucoles (*Mucor subtilissimus* UCP 1262, *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 e *Rhizopus microsporus* UCP 1304) isolados da caatinga de Pernambuco / Miller da Costa Lima Batista e Silva ; orientador Kaoru Okada ; co-orientador Carlos Alberto Alves da Silva, 2017.

ix, [59] f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Coordenação Geral de Pós-graduação. Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2017.

Ambientais,

1. Ácidos graxos. 2 Biodiesel. 3. Mucoles. 4. Substratos agroindustriais. I. Título.

CDU 574.6

PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS E BIOMASSA POR MUCORALES (*Mucor subtilissimus* UCP 1262, *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 e *Rhizopus microsporus* UCP 1304) ISOLADOS DO SOLO DA CAATINGA DE PERNAMBUCO

MILLER DA COSTA LIMA BATISTA E SILVA

Examinadores:

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

Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

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

Defendida em: 10/04/2017

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

*Cada descoberta nova da ciência é uma porta nova,
pela qual, encontro, mais, uma vez Deus, o autor dela.*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela sabedoria concedida, pelas vidas das pessoas que amo, e por mais uma etapa vencida em minha vida. À minha família, em especial, a minha vó (In memoriam), por ter apostado sempre em meu futuro, e minha mãe, pelo cuidado e amor, minha eterna gratidão.

À Prof^a. Dr^a. Kaoru Okada, por sua sabedoria e respeito, na minha orientação, dando-me oportunidade e colaboração, na execução dos meus experimentos, sendo sempre harmoniosa em nossa convivência profissional.

Ao professor Dr^o Carlos Alberto Alves da Silva, pela sua co-orientação, por repassar, com muita sabedoria, seus conhecimentos, com tamanha paciência e disposição, em me ajudar, sempre que o busquei, colaborando para execução dos experimentos, dentro da minha pesquisa, sendo também meu amigo.

À Dr^a. Rosileide Fontenele, pela sua sabedoria, ensinamentos, paciência, amizade, contribuição para organização e execução dos meus experimentos, em nossa convivência profissional e cotidiana, e pelo tempo a mim concedido.

À Coordenação do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia na pessoa da Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki, a quem tenho um enorme respeito, pela sua contribuição profissional, atenção, sabedoria e colaboração na execução dos meus experimentos.

Aos demais professores do Curso de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais, da UNICAP, pelos ensinamentos transferidos a mim, em especial as Professoras Dr^a. Aline Elesbão do Nascimento e Dr^a. Clarissa Daisy Costa Albuquerque, Coordenadora, meu muito obrigado pelo conhecimento compartilhado, pela amizade e convivência profissional.

À Universidade Católica de Pernambuco, na pessoa do Magnífico Reitor Pe. Pedro Rubens Ferreira Oliveira, S.J., o meu agradecimento pelo espaço cedido para que fosse possível executar os meus experimentos.

À Dr^a. Thayse Aves, pela paciência, amizade, contribuição na execução dos experimentos, e por partilhar em nosso cotidiano, sua experiência profissional.

Aos meus grandes amigos de todas as horas, Adriana Souza e Marcos Luna, aos quais tenho um grande respeito, agradeço pela contribuição, paciência e tempo, a mim dedicado, contribuindo assim para engrandecimento dos meus conhecimentos.

Aos colegas do grupo de pesquisa, em Ciências Ambientais e Biotecnologia, e do Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, da Universidade Católica, em especial Tainã e Eduardo, meu muito obrigado, pelo companheirismo e apoio, nesta grande troca de conhecimento, onde estivemos juntos, em nosso cotidiano, turbulento em alguns momentos, mas, muito humano.

Aos técnicos de laboratório André Felipe Santos Lima e Severino Humberto de Almeida, obrigado pela paciência, e colaboração na realização dos meus experimentos.

À Sônia Maria, pela sua amizade, convivência profissional e cotidiana, meu muito obrigado.

Ao Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais (NPCIAMB), da Universidade Católica de Pernambuco, e a Fundação de Amparo, a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), meu respeito e agradecimento, pois, sem os mesmos, não seria possível, mais, uma etapa vencida, de conhecimentos, por mim, adquiridos.

Aos pesquisadores e técnicos do CETENE, responsáveis pelas análises cromatográficas, Katarynna Santos de Araújo (Biofuels Area. Central Analytical), Mariana Oliveira Barbosa (Biofuels Area. Central Analytical), Esteban Espinosa Vidal (Biofuels Area. Central Analytical), em especial a Tayane de Cássia Dias Mendes Silva (Labio. CETENE/UFPE), obrigado pela contribuição.

À banca examinadora, pelas contribuições finais para a concretização e melhoramento deste trabalho.

À todos que contribuíram, direta e indiretamente, meu muito obrigado, por tudo.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| AGRADECIMENTOS | i |
| LISTA DE FIGURAS | v |
| LISTA DE TABELAS | vi |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | vii |
| RESUMO..... | viii |
| ABSTRACT | ix |
| CAPÍTULO I | 10 |
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 OBJETIVOS | 13 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 13 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 13 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA | 14 |
| 3.1 LIPÍDEOS..... | 14 |
| 3.2 APLICAÇÃO DE LIPÍDEOS FÚNGICOS NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL | 15 |
| 3.3 CAATINGA | 15 |
| 3.4 BIOCOMBUSTÍVEIS | 17 |
| 3.4.1 BIOCOMBUSTÍVEIS NO BRASIL | 18 |
| 3.4.2 BIODIESEL | 19 |
| 3.5 ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS (PUFA) ÔMEGAS 3 E 6 | 21 |
| 3.6 MICRO-ORGANISMOS..... | 23 |
| 3.6.1 MICRO-ORGANISMOS DE INTERESSE INDUSTRIAL | 24 |
| 3.6.2 MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE LIPÍDEOS | 25 |
| 3.6.3 MUCORALES..... | 27 |
| 3.6.4. GÊNERO <i>Cunninghamella</i> | 27 |
| 3.6.4.1 <i>Cunninghamella echinulata</i> | 28 |
| 3.7 FONTES ALTERNATIVAS PARA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS | 29 |
| 3.7.1 MELAÇO DE CANA DE AÇÚCAR | 30 |
| 3.7.2. MILHOCINA | 31 |
| 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 32 |
| CAPÍTULO II | 46 |
| 1 INTRODUÇÃO | 48 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 49 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 51 |
| 4 CONCLUSÃO..... | 58 |

| | |
|------------------------------------|----|
| 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 58 |
| CAPÍTULO III | 62 |
| CONCLUSÕES GERAIS..... | 63 |

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Região da Caatinga do Brasil | 16 |
| Figura 2 - Estrutura dos ácidos graxos | 27 |
| Figura 3– Características microscópicas e macroscópicas de <i>Cunninghamella echinulata</i> isolada do solo da Caatinga, no Nordeste do Brasil. Fotografias de microscopia óptica (A) e crescimento em ágar Sabourord dextrose (B). | 28 |

CAPÍTULO 2

| | |
|---|----|
| Figura 1 - A - Estudo histoquímico do micélio da <i>C. echinulata</i> UCP/WFCC 1299 nos meios de culturas (MCM) - A – (MCM) e (SMM) - B..... | 53 |
| Figura 2 - Diagrama de pareto para análise do melaço de cana de açúcar, milhocina e pH na produção de biomassa (A) e lipídeos totais (B) por <i>Cunninghamella echinulata</i> UCP/WFCC 1299.... | 55 |
| Figura 3 - Gráfico de Cubo para análise das interações do melaço de cana-de-açúcar, milhocina e pH na produção da biomassa por <i>Cunninghamella echinulata</i> UCP/WFCC 1299 | 55 |

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 - Composição físico-química do melaço-de-cana-de-açúcar bruto31

Capítulo 2

Tabela 1 - Níveis de melaço de cana de açúcar e milhocina para a produção de biomassa e lipídeos.....50

Tabela 2 – Seleção da produção de biomassa e lipídeos totais por *Cunninghamella echinulata*, *R. microsporus* e *M. subtilíssimus*.....52

Tabela 3 - Produção de biomassa e lipídeos totais por *Cunninghamella echinulata* em meio contendo diferentes concentrações de milhocina e melaço de cana de açúcar e diferentes pH, a partir do planejamento fatorial 2^353

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP - Adenosina Monofosfato

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

BDA – Batata Dextrose Agar

C – Carbono

CNPE - Conselho Nacional de Política Energética

EMAGs - Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos e Glicerol

GC - Cromatografia em Fase Gasosa

Mb – Milhões de barris

MDA - Ministério do Desenvolvimento Agrário

MME - Ministério de Minas e Energia

N – Nitrogênio

ND – Não detectado

pH - Potencial Hidrogeniônico

PNPB - Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel

PUFAs - Ácidos Graxos Poliinsaturados

SCO - Óleos de Célula Único

UV – Ultra Violeta

RESUMO

Os lipídeos obtidos por via microbiológica surgem como uma alternativa promissora em diversas aplicações industriais, considerando as inúmeras vantagens que apresentam quando comparado aos lipídeos derivados de fontes vegetais e animais. Uma seleção de fungos da Ordem Mucorales (*Mucor subtilíssimus* UCP 1262, *Cunninghamella echinulata* UCP1299 e *R. microsporus* UCP 1304), isolados do solo da Caatinga de Pernambuco, foi realizada com a finalidade de avaliar a acumulação de lipídeos utilizando fontes alternativas renováveis. O cultivo dos fungos foi realizado em meios contendo diferentes concentrações de melaço de cana-de-açúcar e milhocina, e diferentes valores de pH, através de um planejamento fatorial de 2³. A linhagem selecionada com maior potencial de produção de biomassa e lipídeos foram obtidos por gravimetria. Os lipídeos totais foram quantificados após extração com o sistema clorofórmio:metanol (v/v), e a identificação dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia em fase gasosa (GC); e maior acumulação de lipídeos foi evidenciada pelo método histoquímico. Os resultados obtidos demonstraram que a *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 produziu o maior conteúdo de biomassa (9,05g/L) e lipídeos totais (46,96%), no meio contendo 10% de melaço de cana de açúcar e 5% de milhocina, em pH 6.0. A seleção do micro-organismo e meio de produção foram evidenciadas através do planejamento fatorial na condição 4, (milhocina a 8%, melaço de cana-de-açúcar a 12% e pH 6), com máxima produção de biomassa de 10,1g/L e de lipídeos 47,86% respectivamente. Os resultados obtidos evidenciaram que *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 converteu os resíduos agroindustriais renováveis em biomassa, acumulando elevado teor de lipídeos, possibilitando a minimização resíduos ambientais, sem tratamento prévio, além de favorecer a elevação do valor agregado.

Palavras-Chave: 1 Ácidos graxos, 2 Biodiesel, 3 Milhocina, 4 Melaço de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

Lipids obtained from microorganisms appear as a promising alternative for various industrial applications due to the innumerable advantages when compared to lipids derived from plant and animal sources. In this context, the objective of this work was to select Mucorales (*Mucor subtilissimus*, *Cunninghamella echinulata* and *R. microsporus*) fungi isolated from the Pernambuco Caatinga soil, which are potentially capable of producing biomass and lipids using alternative renewable sources. The cultivation of the Mucorales was carried out in means of production containing different concentration of sugarcane molasses and, different concentrations pH. From the selected medium, the strain with high potential to produce biomass and lipids was grown in new concentrations established from factorial planning. The yields of the biomass were calculated by gravimetry, the total lipids quantified after extraction by chloroform and methanol and the identification of the fatty acids was performed by gas chromatography (GC). Subsequently, a histochemical study was performed with the selected fungus. The data obtained showed that *Cunninghamella echinulata* was able to simultaneously produce high production of biomass (9,05g / L) and total lipids (46,96%) in a medium constituted by 10% of sugarcane molasses and 5% of corncina, With pH 6.0. From this selected medium, the results of the planning showed that the maximum production of biomass (10,1g / L) and lipids (47.86%) occurred in condition 4, in a medium constituted by maize (8%), cane molasses Of sugar (12%) and pH 6.0. In this way the data obtained show the high potential of *Cunninghamella echinulata* as a promising microorganism for the simultaneous production of biomass and lipids from renewable raw material, constituting an important technology to minimize environmental problems.

Key words: 1 Biomass, 2 Lipids, 3 Agroindustrial wastes, 4 Mucorales.

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

Estudos vem sendo desenvolvidos em busca de espécies ou isolados capazes de degradar e sintetizar compostos utilizados em processos biotecnológicos de interesse agrícola, industrial e/ou ambiental (SOUZA et al., 2017).

Considerando a capacidade de alguns micro-organismos acumularem significativamente lipídeos nas suas células, *single-cell oil* (SCO), vem mostrando resultados significativos deste a década de 1980. A literatura descreve o acúmulo de óleos em micro-organismos, em especial em espécies de fungos e poucas bactérias capazes de produzir lipídeos para utilização de fins comestíveis (RATLEDGE, 2005, BORDIM et al., 2017).

Em micro-organismos, o acúmulo e a composição de lipídeos são influenciados pela constituição genética e por fatores como condições de cultura (temperatura, pH, tempo de cultivo e composição do meio) (MENG et al., 2009).

Lipídeos de origem microbiana são fontes alternativas de óleos, especialmente de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), que são compostos orgânicos alifáticos com papel ácido e mais de uma dupla ligação na cadeia. Ácidos graxos de cadeia curta ($C_{14:0}$ e $C_{12:0}$) e cadeia longa ($C_{20:0}$ e $C_{22:0}$) são gerados em pequenas quantidades, destacando-se os PUFAs como primordiais na dieta normal, para prevenção de doenças associadas à nutrição (ALONSO e MAROTO, 2000).

O teor de lipídeos nos esporos de fungos em média varia de 5 a 17% do peso seco, mas esporos de algumas espécies, como fungos da ferrugem contêm até 35% de lipídeos. Os principais fatores que influenciam a produção de lipídeos são a relação C:N disponíveis como nutrientes no meio de produção. Ácido palmítico C_{16} normalmente é o ácido graxo saturado e oléico ($C_{18:1}$) e linoléico ($C_{18:2}$) são os principais ácidos graxos insaturados (PUPIN et al., 2000; GAO et al, 2013).

O cultivo de micro-organismos em bioprocessos submersos ou sólidos têm a finalidade de produzir bioprodutos aplicáveis em diversos setores industriais. Assim, os estudos com a obtenção de lipídeos via microbiana por

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 12
fermentação submersa vêm crescendo, considerando a variedade de produtos obtidos e elevado rendimento econômico (SOARES et al., 2010; ZEN et al., 2014; REINEHR, 2016).

A substituição de nutrientes convencionais por resíduos de fontes renováveis como melaço de cana de açúcar, milhocina, óleos pós-fritura e materiais lignocelulósicos são substratos que contribuem favoravelmente para a redução dos custos de produção, da minimização do descarte de resíduos agroindustriais e como alternativas inovadoras (CERQUEIRA et al., 2010; IMURA et al., 2013).

Assim, a produção de biomassa fúngica utilizando resíduos agroindustriais como fontes de carbono e nitrogênio, vêm sendo considerada viável para a produção simultânea de bioprodutos, como lipídeos (DE PARIS et al., 2010; ZEN et al., 2014).

Uma eficiente alternativa que vem sendo bastante pesquisada é a produção de moléculas com características eficientes para a produção de biocombustíveis. Os micro-organismos são capazes de produzir biocombustíveis tais como o bioetanol, biodiesel, e biogás, que vem sendo bastante utilizados no cenário mundial. Devido ser uma energia vantajosa, não provocar impactos ambientais e não produzir materiais perigosos, caracterizando-se como um processo limpo (ANTUNES; SILVA, 2011; OLIVEIRA; BATISTA, 2015)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da Caatinga de Pernambuco, na produção de biomassa e lipídeos, empregando substratos agroindustriais.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar amostras de Mucorales (*Cunninghamella echinulata*, *Rhizopus microsporus* e *Mucor subtilíssimus*) com elevada produção de biomassa e lipídeos, empregando resíduos agroindustriais como substratos;
- Avaliar a acumulação lipídeos nas amostras selecionadas utilizando o método de Sudan Black B;
- Utilizar a amostra selecionada para produção de biomassa lipídeos, em meios alternativos contendo milhocina e melação de cana-de-açúcar;
- Avaliar a influência dos resíduos utilizados no meio de fermentação submersa na produção de biomassa e lipídeos, utilizando planejamento fatorial completo 2^3 ;
- Avaliar o perfil dos ácidos graxos presentes nos lipídeos totais produzidos pela amostra selecionada, na melhor condição do planejamento fatorial;
- Validar estatisticamente os resultados obtidos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 LIPÍDEOS

Lipídeos são moléculas biológicas solúveis em solventes orgânicos, tais como éter etílico, éter de petróleo, clorofórmio, n-hexano, etanol à quente e acetona (MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015).

Segundo a literatura a produção de lipídeos e proteínas pode ser realizada por intermédio da produção de biomassa fúngica, após crescimento em resíduos agroindustriais (DE PARIS et al., 2010; ZEN, et al., 2014).

Os ácidos graxos e seus derivados, presentes em óleos e gorduras, são excelentes matérias/primas utilizadas em diversos setores da indústria química, alimentar e de energia (DONOT et al., 2014).

Segundo ZHAO, 2008, quanto maior os compostos de cadeias de ácidos graxos, que chegam a ter tamanhos entre 14 e 20 carbonos, provêm-lhes atrativas características industriais.

A via metabólica da acumulação de lipídeos em micro-organismos oleaginosos ocorre sucintamente, em condições limitantes de nitrogênio, a concentração de adenosina monofosfato (AMP) diminui e a concentração de citrato aumenta viabilizando o acúmulo de lipídeos (RATLEDGE, 1991).

Os lipídeos são sintetizados através de várias rotas, isso decorre, pois variam consideravelmente em composição química. Pela ligação de glicerol à ácidos graxos as células sintetizam gordura. O maior papel dos lipídeos é servir como componentes estruturais de membranas biológicas, tendo os fosfolipídeos como a maioria dos lipídeos de membrana. Funcionam também como estoque de energias, como carotenoides fornecendo pigmentos vermelhos, alaranjados, e amarelos de alguns micro-organismos, outros lipídeos formam porções das moléculas de clorofila (TORTORA, CASE, FUNKE, 2016).

A análise da composição de ácidos graxos por métodos cromatográficos constitui o primeiro passo para a avaliação da qualidade do óleo bruto e/ou

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 15
seus produtos de transformação (COSTA NETO et al., 2000; FERREIRA et al., 2008).

3.2 APLICAÇÃO DE LIPÍDEOS FÚNGICOS NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Diversos autores descreveram a viabilidade da utilização de fungos na produção de lipídeos para diversos fins (biodiesel, ácidos graxos, bio-óleo) e de SCO (*single cell oil*) (ABU-ELREESH et al., 2013; NANGUL et al., 2013; ABU-ELREESH; ABD-EL-HALEEM, 2014; BABU et al., 2014; BHANJA et al., 2014 LOPES, 2017).

Ácidos graxos produzidos através de óleos vegetais e animais servem como a matéria-prima para inúmeras aplicações como a produção de biodiesel, agentes tensoativos, solventes e lubrificantes (XIN; YANG; XU; ZHANG; NIE; XIAN; 2009). O aumento da demanda e oferta limitada destes óleos tem resultado numa competição com os alimentos, preços elevados, questionáveis práticas de uso da terra e as preocupações ambientais associados à sua produção. Uma rota alternativa promissora de produção desses combustíveis e produtos químicos é a utilização de micro-organismos na conversão microbiana de matérias-primas renováveis, como a biomassa derivada de carboidrato, ou como produtores de biomassa para produção de bio-energia. Como fonte de energia renovável, a biomassa pode ser utilizada diretamente, ou indiretamente convertida em outro tipo de produto energético, tais como biocombustível (MENG et al., 2009; SARRIS et al., 2017).

3.3 CAATINGA

A Caatinga localiza-se no semiárido nordestino brasileiro, possuindo uma vegetação típica à região. É um ecossistema que exhibe espécies vegetais com características anatômicas, morfológicas e funcionais adaptados à sobreviver sob diversas adversas de solo e clima, característicos desta fisionomia (PEREIRA JÚNIOR et al., 2012; MARANGON et al., 2017).

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 16

Cerca de 11% do território nacional corresponde a Caatinga, e é a vegetação predominante do Nordeste do Brasil, cobrindo 55% dos 1.548.672 km² da área total (SCHISTEK, 2012). Este bioma envolve áreas dos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Piauí, Bahia e Minas Gerais (ANDRADE et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2014) (Figura 1).

Figura 1 – Região da Caatinga do Brasil



Fonte: Biomas Brasileiros, 2015.

Essa região apresenta uma vegetação xerofítica distribuída de forma irregular, com áreas apresentando solo quase descoberto e rios intermitentes sazonários, fortemente vinculados aos atributos de um clima árido, dotado de longa estação seca e falta de regularidade pluviométrica, envolvendo precipitações anuais que variam de 260 a 800 mm (OLIVEIRA et al., 2014).

Apenas 47% da vegetação natural da Caatinga foram mantidas. E devido aos fatores naturais e antropogênicos, ela é classificada como um ecossistema frágil e sujeito à desertificação. Apesar da importância biológica, a diversidade microbiana dos solos da Caatinga ainda é pouco conhecida, porém devido às condições climáticas severas, como alta temperatura, elevada exposição UV, e longos períodos de seca, podem induzir o aparecimento de micro-organismos com composição taxonômica e funcional bastante característica em relação a outros biomas (MENEZES et al., 2012; PACCHIONI et al., 2014).

O solo armazena organismos vivos e proporciona altas taxas metabólicas que ocorrem em seu interior, por existirem raízes e decomposição da matéria orgânica. É nesta região, a da rizosfera, onde existe maior atividade microbiana, em razão da presença de exsudatos e secreções radiculares, que representam a maior parte do carbono disponível para os micro-organismos. Sem a influência das raízes e da atividade da biota que funcionam de forma simbiótica, o solo pode ser considerado oligotrófico ou relativamente pobre em fontes de carbono disponíveis (ARAÚJO, MONTEIRO, 2007; DE BARROS, 2012).

A reciclagem de nutrientes acumulados na superfície do solo desempenha um importante papel para obtenção de micro-organismos como, por exemplo, os fungos conidiais, que são ótimos decompositores deste ambiente. Apesar das condições extremas, estudos comprovam que a Caatinga é rica em espécies animais e vegetais, embora apresente condições de solo bastante alterado pela perturbação e degradação ambiental causada pelo uso irracional dos recursos naturais o que tem levado à rápida perda de espécies e de processos ecológicos importantes para a manutenção dos seus ecossistemas (GIONGO et al., 2012; MELLO et al., 2012).

Em um estudo sobre a diversidade de fungos no semi-árido brasileiro, foi possível apresentar uma listagem com 451 espécies distribuídas entre os Filos Ascomycota, Basidiomycota, Oomycota, Zygomycota e os fungos conidiais, sendo estes representados por 198 espécies (MAIA et al.; 2002; SANTA IZABEL et al., 2011).

3.4 Biocombustíveis

Devido à globalização e a crescente demanda por energia, a escassez torna-se um grande problema em todo mundo. É possível que o crescimento da produção de petróleo e gás, que são de fácil acesso, não conseguirá atender a população dos anos de 2040-2050, considerando que o nível da demanda de petróleo vai aumentar de 85 milhões de barris por dia, de 2008 para 105 milhões de barris por dia em 2030 e, além do que, o número de veículos tende

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 18
a aumentar para 1,3 bilhões em 2030 e para 2 bilhões em 2050 (BAEYENS et al., 2015).

Os biocombustíveis surgiram como alternativa de substituição, parcial ou totalmente, combustíveis provenientes de petróleo e gás natural nos motores à combustão, ou nos demais tipos de geração de energia, pois os mesmos são oriundos de biomassa renovável. Os efeitos positivos, da produção de biocombustíveis, surgem da necessidade de utilização de uma das mais significativas fontes de energia sustentável, atendendo assim, três importantes políticas de desenvolvimento: o desenvolvimento econômico, a segurança energética mundial e a proteção ambiental (BAUTISTA et al., 2016).

A diminuição da disponibilidade dos combustíveis fósseis e os danos ambientais oriundos da emissão de gases de dióxido de carbono e outros gases de efeito estufa são algumas das problemáticas preocupantes que vem crescendo cada dia mais. É característica dos biocombustíveis, ter baixa toxicidade, ser biodegradáveis, renováveis e capazes de reduzirem as emissões de gases danosos ao mundo. Por consequência disso, estão sendo realizadas novas pesquisas, voltadas ao desenvolvimento de uma melhor produção de biocombustíveis provenientes de recursos renováveis (PALUDO, 2014; OLIVEIRA; BATISTA, 2015).

3.4.1 Biocombustíveis no Brasil

Com o surgimento do Programa Nacional do Alcool – Proálcool, originou-se no Brasil a produção de biocombustíveis, anos depois em meio a depleção do petróleo na década de 70, foi originado o Programa de Produção de Óleos Vegetais para Fins Energéticos – Pro-óleo (RICO; SAUER, 2015).

No Brasil os principais biocombustíveis líquidos utilizados, são o etanol proveniente da cana-de-açúcar, e o biodiesel, produzido a partir de gorduras animais ou de óleos vegetais e adicionado ao diesel de petróleo em proporções variáveis (ANP, 2015).

O Ministério do Desenvolvimento Agrário (MDA) criou em 2004, o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, o PNPB. Programa que

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 19

visa promover o desenvolvimento econômico e sustentável do país, através da introdução do biodiesel na economia brasileira (MDA, 2016a). Visando ainda, a valorização da agricultura familiar e o estímulo aos produtores de biocombustíveis a adotar a produção de biodiesel, foi criado o Selo Combustível Social, por meio da compra de matéria-prima e da disponibilização de treinamento adequado aos agricultores envolvidos, por exemplo. E em troca, o MDE fornece algumas vantagens aos produtores de biodiesel, variando desde a facilitação à obtenção de financiamento até a redução dos valores de impostos cobrados aos mesmos, pelo governo (MDA, 2016b).

Desde 1º de novembro de 2014, a produção de biodiesel no Brasil, é considerada área prioritária para o desenvolvimento do país. O Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) estabeleceu uma regra que aumentou, de 5% para 8% o percentual de adição de biodiesel ao diesel, demonstrando assim, o sucesso do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (ANP, 2015).

3.4.2 Biodiesel

O Brasil se destaca como maior produtor de biodiesel proveniente da capacidade de produção de uma gama produção de grãos dos quais os óleos vegetais são extraídos. O (PNPB) – Programa Nacional de Uso de e Produção de Biodiesel é uma iniciativa inovadora, que surgiu com o intuito de promover e fomentar a produção desse biocombustível no Brasil, a fim de se obter uma energia mais limpa e renovável, além de promover e aumentar a renda no campo (DINIZ, 2013).

Segundo o PNPB, o biodiesel é definido como um “biocombustível derivado de fontes renováveis para uso em motores de combustão interna com ignição ou para geração de outro tipo de energia que possa substituir parcial ou totalmente os combustíveis fósseis” (LOURINHO; BRITO, 2015).

Segundo ADEWALE; DUMONTN; NGADI, 2015, o biodiesel também é definido como uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos, oriundo da

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 20
transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com álcoois de cadeia curta, dando origem ao glicerol como coproduto.

O biodiesel possui diversas vantagens quando comparado ao diesel proveniente do petróleo. Segundo estudos da National Biodiesel Board (associação que representa a indústria de biodiesel nos Estados Unidos) demonstraram que a queima do biodiesel pode emitir em média 48% menos monóxido de carbono; 47% menos material particulado (que penetra nos pulmões); 67% menos hidrocarbonetos. Destacando o biodiesel, por se tratar de um biocombustível renovável, considerado como um grande avanço na tentativa de substituir o óleo diesel, por biomassa renovável (LI et al., 2012; SOLOMON et al., 2014; ANP, 2015).

O biodiesel é renovável, biodegradável, possui propriedades similares ao diesel, incluindo uma maior eficiência de combustão, e apresenta um perfil de menor emissão de gases de efeito estufa, enxofre e material particulado durante a combustão (LEUNG et al., 2010; CHRISTOPHER et al., 2014).

Houve um aumento da produção de biodiesel no Brasil, proveniente dos diversos incentivos governamentais e da crescente importância do consumo do biodiesel, em 2010 o Brasil alcançou um lugar de destaque na produção de biodiesel, tornando-se o segundo maior produtor mundial com 2,4 mil m³, atrás apenas da Alemanha, que teve uma produção de 2,7 mil m³. Já em 2011, o Brasil caiu uma posição, ficando atrás dos Estados Unidos e Alemanha (OECD/FAO, 2011).

Em 2014, os Estados Unidos foram o maior produtor mundial de biocombustíveis, com 59,0 milhões de m³ (54,3 milhões de m³ de etanol e 4,7 milhões de m³ de biodiesel). O Brasil ficou na segunda posição, produzindo 29,9 milhões de m³ (26,5 milhões de m³ de etanol e 3,4 milhões de m³ de biodiesel). A produção mundial de biocombustíveis foi de 123,7 milhões de m³ (94,0 milhões de m³ de etanol e 29,7 milhões de m³ de biodiesel) (MME, 2015).

Uma eficiente alternativa que vem sendo bastante pesquisada é a produção de moléculas com características eficientes para a produção de biocombustíveis. Os micro-organismos são capazes de produzir biocombustíveis tais como o bioetanol, biodiesel, e biogás, que vem sendo

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 21

bastante utilizados no cenário mundial. Devido a ser uma energia vantajosa, não provocar impactos ambientais e não produzir materiais perigosos, caracterizando-se como um processo limpo (ANTUNES; SILVA, 2011).

3.5 Ácidos graxos polinsaturados (pufa) ômega 3 e 6

A capacidade de produção de ácidos graxos essenciais da família ômega 3 por fungos é de grande interesse científico, uma vez que estes microrganismos são capazes de se desenvolver em condições variadas, apresentando-se como alternativa viável para a produção dos mesmos. Os referidos ácidos graxos são de grande importância na alimentação humana, devido seus efeitos benéficos ao organismo, como, por exemplo, a redução no desenvolvimento de problemas cardiovasculares e de outras doenças crônico-degenerativas. Atualmente, a principal fonte alimentar de ácidos graxos ômega 3 é a ingestão de pescados marinhos, mas existem algumas preocupações sobre os riscos potenciais para a saúde, incluindo contaminantes ambientais, tais como alguns metais, além de questões ecológicas relacionadas com a extinção de algumas espécies (FRANCISCO et al., 2017).

As investigações científicas têm comprovado que as dietas com quantidades adequadas de AGPI n-3 e AGPI n-6 exercem papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares e aterosclerose, doenças inflamatórias crônicas, no crescimento fetal e desenvolvimento neural, obstrução da vasoconstrição e agregação plaquetária, ação anti-inflamatória e antitrombótica, ação sobre a prevenção do câncer, e cooperação nas funções imunomoduladoras. Pequenas concentrações ou ausência desses componentes, aumentam a probabilidade de desenvolvimento de várias doenças degenerativas e cardiovasculares, e aceleram o processo de envelhecimento (PERINI, et al., 2010).

Entre os vários benefícios destes compostos incluem também a prevenção de doenças cardiovasculares, doenças infecciosas e alterações imunológicas. Os ácidos graxos poli-insaturados se destacam também por serem responsáveis pela neuroproteção e neurodesenvolvimento fetal (CORTES et al., 2013).

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 22

Nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, os principais responsáveis pelas mortes de jovens e adultos são as doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares. Embora tenha havido uma diminuição da mortalidade relacionada com essas doenças ao longo dos anos, no Brasil as doenças cardiovasculares foram as causas mais comuns de morte em 2011 (VILLELA et al., 2014; FARIAS, 2014).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC), 29% das mortes no Brasil são causadas por doenças cardiovasculares. Embora que os dados finais não tenham sido finalizados, as mortes estimadas em 2015 já atingem 346.896. Já nos primeiros dias de 2016, mais de 10.000 pessoas morreram no país devido a doenças cardiovasculares, com perspectiva de morte de 350.000 brasileiros durante o ano (SBC, 2016).

Dentre os ácidos graxos poli-insaturados, os AGPI ômega-3 (AGPI n-3) e AGPI ômega-6 (AGPI n-6) são evidenciados por fornecerem efeitos benéficos à saúde humana. Em experimentos com animais, os camundongos (*Mus musculus*) vêm sendo utilizados nestes estudos, devido a sua semelhança com humanos e por gerarem informações do organismo como um todo. A manipulação destes AGPI na dieta fornece dados para se verificar a incorporação e síntese dos mesmos nos tecidos (PERINI, et al., 2010).

Os ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6 possuem vários efeitos sobre a resposta imune e inflamatória. O balanço na ingestão destes AG, e por consequência a incorporação dos ácidos graxos poli-insaturados na membrana das células imunes, é significativo para determinar a gravidade do processo inflamatório. Os ácidos graxos poli-insaturados n-3 possuem efeitos supressores, como produção de anticorpos e citocinas, inibição da proliferação de linfócitos, expressão de moléculas de adesão e ativação das células *Natural Killers* (NK). Todavia, os ácidos graxos poli-insaturados n-6 apresentam ambos os efeitos, tanto inibitório quanto estimulatório da resposta imune (ANDRADE, CARMO, 2006; CALDER et al., 2009).

3.6 MICRO-ORGANISMOS

Os micro-organismos apresentam uma grande diversidade por habitarem diversos ambientes (água, solo e água). O Reino Fungi comporta mais de 100.000 espécies descritas na literatura (MALAJOVICH, 2012).

Os fungos são seres eucarióticos, isto é, apresentam uma membrana nuclear que envolve os cromossomos e o nucléolo; são classificados como seres heterotróficos por não possuírem pigmentos fotossintéticos, capazes de absorver energia luminosa e utilizá-la para síntese de compostos orgânicos, e aproveitarem a energia contida nas ligações químicas de vários nutrientes por absorção, que possuem parede celular constituída por quitina e β -glucano, apresentam material de reserva energética na forma de glicogênio ou lipídeos, podem ser unicelulares e/ou multicelulares, microscópicos e/ou macroscópicos, com reprodução assexuada e/ou sexuada, resultando na formação de esporos (SIDRIM et al., 2004; SILVEIRA, 2013).

Os micro-organismos oriundos do solo são classificados em cinco grandes grupos: actinomicetos, bactérias, algas, protozoários e fungos, porém cerca de 90% da atividade microbiana do solo são oriundas dos fungos e bactérias (ANDREOLA, FERNANDES, 2007; LOPES, 2016).

Especificamente os fungos, são encontrados em comunidades em maior quantidade no solo (ALEXOPOULOS et al., 1996; LOPES, 2016). Os fungos por serem em sua maioria microscópicos e habitarem em diversos substratos ainda são praticamente desconhecidos. Dados descrevem que menos de 5%, das 1.500.000 espécies de fungos que se supõe existir, tenham sido classificadas (HAWKSWORTH et al., 2001; LOPES, 2016).

Os Zygomycetes apresentam geralmente em suas estruturas hifas cenocíticas, com a presença de septos apenas na base das estruturas reprodutivas, podendo também apresentar septos espaçados de forma irregular, a reprodução assexuada é realizada através de esporos não móveis formados por um esporângio sobre um esporangióspero, enquanto a reprodução sexuada é por fusão de gametângios formados nas extremidades

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 24
de hifas aéreas, zigóforos, dando origem a esporos dormentes, zigósporos (MOREIRA 2006; LOPES, 2016).

Nessa classe encontram-se distribuídas sete ordens, trinta e duas famílias e cento e trinta gêneros, com aproximadamente novecentas espécies. A ordem Mucorales possui o maior número de espécies (cerca de trezentas). O gênero *Cunninghamella*, apresentando dez espécies, entre elas três principais: *C. elegans*, *C. echinulata* e *C. bertholletiae* encontram-se entre os fungos dessa ordem (HIBBETT et al., 2011; LOPES, 2016).

Micro-organismos que acumulam intracelularmente lipídeos na forma de glóbulos discretos, estando estes em teores acima de 20%, são considerados pertencentes ao conjunto de espécies de micro-organismos oleaginosos (MORETON, 1988; GARAY et al., 2016).

3.6.1 Micro-organismos de interesse industrial

Embora estejam frequentemente associados a processos de deterioração ou patológicos, os micro-organismos possuem habilidades na produção de substâncias químicas (bioativos) com numerosas aplicações em diversos setores: indústria do meio ambiente, da agricultura, farmacêutica, dentre outras, tornando esses agentes de grande importância para a indústria e, especialmente, para a Biotecnologia (CONTI; GUIMARÃES; PUPO, 2012; LIMA; ALMEIDA; MATOS, 2016).

Estima-se que apenas 1% dos micro-organismos é estudado, em virtude da dificuldade de cultivá-los utilizando técnicas comuns de laboratório. Porém, existem diversos bioprodutos oriundos de micro-organismos passíveis de serem cultivados. Aditivamente, grande parte do mundo microbiano, ainda é inexplorado, possuindo habilidade de ser estudado para a descoberta de novos bioprodutos de interesse industrial (CRAGG, NEWMAN, 2013).

O Brasil é país considerado privilegiado, devido a sua megabiodiversidade, sendo fonte imensurável para a produção de novas moléculas com diferentes aplicabilidades para o desenvolvimento de cosméticos, biocombustíveis, alimentos, defensivos agrícolas, novos fármacos,

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 25
etc. Todavia, as estatísticas demonstram que é pouca explorada a transformação dos ativos naturais em ativos intangíveis empregando a biotecnologia, mesmo com os avanços demonstrados pela literatura (ZUCOLOTTO; FREITAS, 2013; ROCHA et. al, 2016).

Considerados como as entidades bióticas mais numerosas e antigas, os micro-organismos colonizaram vários nichos do planeta com sucesso (OLIVEIRA; SETTE; FANTINATTIGARBOGGINI, 2006; LIMA; ALMEIDA; MATOS, 2016), todavia, as informações obtidas acerca da dinâmica das comunidades destes seres presentes em amostras ambientais ainda são escassas. Dados demonstram que menos de 1% e no máximo 10% das espécies microbianas existentes em amostras naturais foram classificadas (ZILLI et al., 2003; LIMA; ALMEIDA; MATOS, 2016).

A medida que novas aplicações biotecnológicas e produtos oriundos do uso de micro-organismos entram no mercado, é provável que afete nossas vidas e bem-estar de maneira imaginável. O interesse pela utilização de fontes renováveis de energia, como o hidrogênio e o etanol, surgiu como alternativa para suprir a escassez de energia fóssil. Podemos constatar que o uso de micro-organismos tem sido extremamente útil para a humanidade e continuará sendo parte essencial de muitas tecnologias de processamento de alimento (TORTORA, CASE, FUNKE, 2016).

Diversos estudos têm sido frequentemente realizados com o objetivo de produção de biocompostos aplicáveis em diversos setores industriais. A partir disto, são crescentes os estudos visando a produção de lipídeos, a partir de células microbianas, salientando o uso de fungos filamentosos, uma vez que existe uma grande diversificação de produtos e rendimentos econômicos consideravelmente altos oriundos dos mesmos (SOARES et al., 2010; COLLA et al., 2014).

3.6.2 Micro-organismos produtores de lipídeos

Segundo Vicente e colaboradores (2009) são caracterizados como espécies oleaginosas, as capazes de produzir e acumular mais de 20-25% de lipídeos, e a maioria desses óleos produzidos por esses micro-organismos

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 26

encontram-se na forma de triglicerídeos, principal componente do óleo vegetal. Portanto, esses lipídeos provenientes de espécies oleaginosas podem ser usados como matéria-prima para a produção de biodiesel, utilizando a reação de transesterificação em que o triglicerídeo reage com metanol na presença de um catalisador ácido (HCl ou H₂SO₄) ou básico (NaOH ou KOH) para a produção de ésteres metílicos de ácidos graxos e glicerol (EMAGs) (THLIVEROS et al., 2014; OLIVEIRA; BATISTA, 2015).

Alguns micro-organismos transformam carboidratos e outros nutrientes em lipídeos e acumulam no interior das células. A maioria dos micro-organismos oleaginosos utiliza glicose como substrato para produção de lipídeos (LI et al., 2012). Dependendo do micro-organismo e das condições de cultura utilizada, o teor da composição dos lipídeos acumulados são bem distintos (RATLEDGE, 1996, 2002; LI; ZHAO; BAI, 2007; MENG et al., 2009; LI et al., 2012).

Os lipídeos em micro-organismos oleaginosos podem decorrer de três diferentes fontes, podendo ser externas quando estes são complementados no meio de cultura e transportados ao interior da célula, condensados pela via endógena na qual fosfolipídeos ou glico/lipoproteínas são rompidos, ou pela síntese biológica de novos triglicerídeos (TEHLIVETS et al., 2007).

Segundo VOET; VOET; PRATT, os ácidos graxos classificam-se como sendo saturados ou insaturados, podendo conter uma ou mais duplas ligações. Em geral, os ácidos graxos apresentam número par de átomos de carbono. Na nomenclatura comum, o átomo de carbono adjacente ao carbono carboxílico é denominado α , e os carbonos seguintes são nomeados β , γ , δ , etc. (Figura 2).

Segundo MOTTA, 2004, a maioria dos ácidos graxos é sintetizada pelo homem, exceto ácido linoléico e o ácido linolênico, denominados ácidos graxos essenciais e são obtidos da dieta. Os ácidos graxos essenciais são precursores para a biossíntese de vários metabólitos importantes. Dietas pobres em ácidos graxos podem ocasionar dermatites, demora na cura de ferimentos, redução na resistência a infecções, alopecia e trombocitopenia.

Figura 2 - Estrutura dos ácidos graxos



Fonte: Revista Analytica, BUITRON, nº 08.

Lipídeos de origem microbiana são potencialmente comercializáveis. Graças a grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), os SCO gerados por fungos e algas são utilizados como nutracêuticos, farmacêuticos e como ração para aquicultura (RATLEDGE, 1993). Grande avanço foi alcançado em quanto à aplicação dos SCO de leveduras na indústria oleoquímica e particularmente na produção de biodiesel, graças à semelhança química com os óleos vegetais (XUE et al., 2006; DAI et al., 2007; LIU; ZHAO, 2007; ANGERBAUER et al., 2008; XIONG et al., 2008; ZHAO et al., 2008).

3.6.3 Mucorales

Mucorales é uma a Ordem de fungos mais estudados, englobando fisiologia, bioquímica, taxonomia e potenciais aplicações em indústria.

Os fungos filamentosos da ordem Mucorales, como *Mortierella sp.*, *Cunninghamella echinulata*, *Mucor rouxii*, *M. circinelloides*, *M. hiemalis*, são mais intensamente estudados para a produção de ácidos graxos poliinsaturados. Os fungos filamentosos *Mortierella sp.* e *C. echinulata*, são conhecidos por acumularem naturalmente elevadas concentrações de lipídeos (AHMED et al., 2006; JEENNOR et al., 2006; CERTIK et al., 2006).

3.6.4. Gênero *Cunninghamella*

Cunninghamella é um gênero de fungo filamentoso, estabelecido por Matruchot em 1903, da família *Cunninghamellaceae*, e um dos mais comuns da

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 28

Ordem Mucorales, encontrado em solos, plantas e outros substratos orgânicos, especialmente em áreas mediterrâneas e subtropicais. Suas colônias apresentam crescimento rápido, micélio algodinoso e variação de cor entre branco, cinza e marrom (MARINHO, 2004; ASHA; VIDYAVATHI, 2009; AMADIO; GORDON 2010).

O gênero *Cunninghamella* tem sido extensivamente estudado, sendo submetido a reações de biotransformação e sendo descrito como uma importante ferramenta para a obtenção de compostos com atividade farmacológica melhorada e uma alternativa a obtenção e isolamento desses compostos a partir de administração em animais e às condições, muitas vezes, hostis e/ou inviáveis da síntese química (AMADIO; GORDON et al., 2010; LUSTOSA; MENEGATTI et al., 2012; PALUDO; SILVA-JUNIOR et al., 2013).

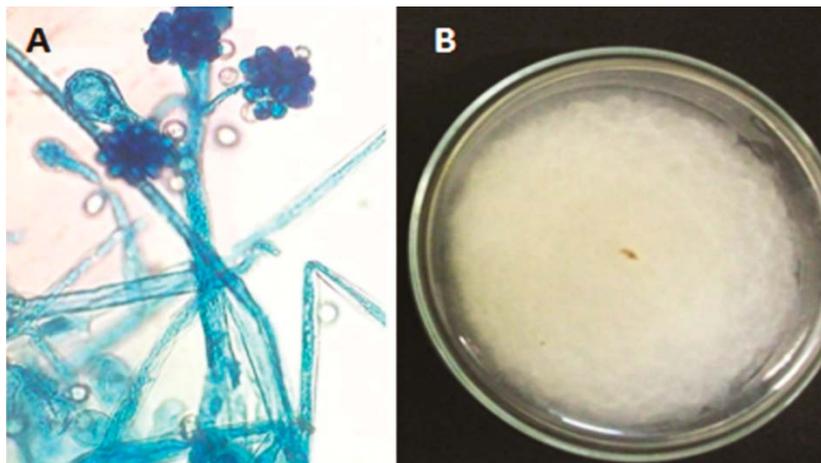
Estudos realizados revelaram que uma quantidade elevada de lipídeos poderia ser acumulada pelas espécies de *Cunninghamella*, dependendo dos métodos de fermentação e das condições de cultura (FAKAS et al., 2007; FAKAS et al., 2009).

3.6.4.1 *Cunninghamella echinulata*

O fungo *Cunninghamella echinulata* possui colônias em cor creme pálido a castanho claro e algodão; seus esporóforos apresentam ramos primários monopodiais, pseudoverticilados, raramente verticilados, também possui ramificações longas e curtas que podem surgir do mesmo esporóforo, podendo formar ramos únicos ou com várias ramificações (SILVA et al., 2014) (Figura 3).

A estrutura da parede celular fúngica e sua sensibilidade à degradação enzimática são fortemente influenciadas pela idade dos micélios e as condições de cultivo (DIAZ-JIMENEZ 2012; BRZEZINSKA-RODAK, KLIMEK-OCHAB, ZYMANCZYK-DUDA, 2016).

Figura 3– Características microscópicas e macroscópicas de *Cunninghamella echinulata* isolada do solo da Caatinga, no Nordeste do Brasil. Fotografias de microscopia óptica (A) e crescimento em ágar Sabouraud dextrose (B).



Fonte: SILVA et al., 2014.

A *Cunninghamella echinulata* também é conhecida por produzir ácido γ -linolênico, que é utilizado como um agente anticancerígeno (FAKAS et al., 2007; BRZEZINSKA-RODAK, KLIMEK-OCHAB, ZYMANCZYK-DUDA, 2016).

Possuindo também grande importância na área médica e servindo como um organismo modelo para vários estudos, incluindo Monensina A (um composto com atividade antibacteriana ou bacteriostática), metabolizada pelos hepatócitos de mamíferos (ASHA; VIDYAVATHI, 2009; PEKALA et al., 2012; BRZEZINSKA-RODAK, KLIMEK-OCHAB, ZYMANCZYK-DUDA, 2016).

3.7 Fontes alternativas para produção de lipídeos

Um dos grandes desafios da atualidade é a procura por um gerenciamento adequado dos resíduos sólidos. Devido ao crescimento da população e os recentes padrões de consumo, cada vez mais enfáticos, observou-se um aumento da produção dos sistemas agroindustriais e agropecuários. Uma enorme quantidade de resíduos é gerada em decorrência do aumento desacerbado da produtividade, acarretando em sérios danos ambientais, quando disponibilizados inadequadamente, criando danos desastrosos de ordem econômica, social e ambiental (VERAS; POVINELLI, 2004; MORALES et al., 2013).

Embora possua relevante teor de nutrientes, a composição química da grande maioria dos resíduos não é equilibrada. Atualmente a ciência e a tecnologia concentram-se especialmente nos 5% da produção anual de resíduos que podem ser utilizados como fonte de nutrientes após serem

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 30

processados de forma básica. Porém os outros 95% demandam técnicas de processamentos mais complexos (químico, físico ou biotecnológico), precedentes a utilização como rações para animais ou alimentos. Entre os 95%, os resíduos orgânicos são os que podem ser facilmente convertidos em alimentos (IYAYI; ADEROLU, 2004; ALTIERI, 2012).

Dentre as alternativas existentes a fim de diminuir estes custos, está o emprego de resíduos agroindustriais, geralmente descartados pela indústria, o qual se mostra uma fonte riquíssima de substratos para aplicação neste processo (STROPARO et al., 2012).

Segundo a literatura, a produção de lipídeos pode ser realizada por intermédio da produção de biomassa fúngica, após crescimento em resíduos agroindustriais (DE PARIS et al., 2010; ZEN et al., 2014). A maioria dos micro-organismos oleaginosos utiliza glicose como substrato para produção de lípideos (LI et al., 2012).

As atividades de valorização de resíduos como alternativa para o aproveitamento em diversos setores industriais são incentivadas, contribuindo para minimizar a poluição ambiental e permitir a utilidade econômica desses materiais (FERNANDES et al, 2008).

3.7.1 Melão de cana de açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma cultura fortemente difundida no Brasil (FARIA, 1993; SANTOS, 2006), utilizada industrialmente para produção de açúcar e álcool (SANTOS, 2006).

As indústrias de açúcar e etanol são responsáveis por mais de 90% do mercado mundial de etanol, caracterizando como sendo o maior programa de combustível renovável do mundo e com uma estimativa de 50% do açúcar (MELO; SAMPAIO, 2016).

No cenário econômico mundial a cultura de cana-de-açúcar assume grande posição, decorrente da importância que seus produtos e subprodutos representam para a população. Dentre os principais produtos e subprodutos economicamente importantes estão o melão, açúcar, água-ardente, etanol, vinhaça e o bagaço (LOPES; DINARDO-MIRANDA; BUSOLI, 2011).

O melão é o subproduto da indústria açucareira e é considerado como uma das matérias-primas mais promissoras na produção de bioprodutos.

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 31

Obtido durante a refinação de cana, também é um lixo orgânico importante devido ao seu elevado teor de açúcar (55%) e alto volume de produção. A disponibilidade e custo de melaço de cana tornam uma matéria-prima atraente para uso em muitos países (BAGY et al., 2014) (Foto 4).

Para que ocorra o crescimento e desenvolvimento de qualquer tipo de micro-organismo é essencial que o substrato preencha as necessidades nutricionais do mesmo e que seja economicamente viável. O melaço de cana-de-açúcar, subproduto da indústria de açucareira, possui na sua composição uma enorme quantidade de açúcares fermentescíveis, classificando o mesmo como um resíduo de baixo custo, fácil manipulação, com grande potencial e muitas aplicações em diversos setores industriais (LIMA, 1987; VALDUGA et al., 2007).

Em virtude da sua composição, Tabela 1, o melaço é utilizado fundamentalmente como fonte de carbono e energia, sendo necessário suplementá-lo com nitrogênio e alguns minerais, especialmente fósforo e magnésio (DIEZ; YOKOYA, 1996, FELTRIN et al., 2000).

Tabela 1 - Composição físico-química do melaço-de-cana-de-açúcar bruto.

| Composição | Concentração (g %) |
|-------------------------------------|---------------------------|
| Nitrogênio | 0,58 |
| Fósforo | 0,015 |
| Potássio | 1,63 |
| Umidade | 9,10 |
| Cinzas | 9,98 |
| Glicídeos redutores em glicose | 14,72 |
| Glicídeos não redutores em sacarose | 33,78 |

Fonte: FELTRIN et al., 2000.

3.7.2. Milhocina

A milhocina é um subproduto da produção de amido de milho, que apresenta grande quantidade de nitrogênio, aminoácidos entre outros nutrientes, industrialmente, o milho seco é macerado em uma solução de ácido sulfúrico a quente; a fração solúvel sofre uma suave fermentação láctica natural que ocorre devido à presença de bactérias na solução, e é, então, submetida a

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 32

uma operação de evaporação, na qual a milhocina é concentrada. A milhocina é utilizada principalmente como suplemento alimentar na fabricação de ração de ruminantes, fonte de nutrientes para aves, na confecção de iscas atrativas de moscas das frutas e fontes de nutrientes para micro-organismos em processo de fermentação industrial, visando a produção de subprodutos de importância comercial (AMARTEY; LEUNG, 2000; FONTES et al., 2008). (Figura 5).

Além disso, a milhocina apresenta composição rica em nutrientes, principalmente aminoácidos e polipeptídeos, os quais são excelentes fontes de nitrogênio para os micro-organismos e possui menos custo em comparação com outras fontes tradicionais de nitrogênio como a peptona e o extrato de levedura. Além disso, estão presentes também vitaminas do complexo B e vários minerais como cálcio, ferro, magnésio, manganês, fósforo, potássio, enxofre, zinco, entre outros (SANTOS, 2010).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEWALE, P.; DUMONT, M.J.; NGADI, M. Recent trends of biodiesel production from animal fat wastes and associated production techniques. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Canada, v. 45, p.574-588, maio 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.02.039>.

AHMED, S. et al. Effects of various process parameters on the production of γ -linolenic acid in submerged fermentation. **Food technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 283-287, 2006.

ALONSO, D. L.; MAROTO, F. G.. Plants as 'chemical factories' for the production of polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 18, n. 6, p.481-497, out. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0734-9750\(00\)00048-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0734-9750(00)00048-3).

ALTIERI, M. A.. Agroecologia, agricultura camponesa e soberania alimentar. **Revista Nera**, São Paulo, n. 16, p.22-32, 2012.

- SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 33
- AMADIO, J.; GORDON, K.; MURPHY, C. D. Biotransformation of flurbiprofen by *Cunninghamella* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Dublin, v. 76, n. 18, p.6299-6303, out. 2010.
- AMARTEY, A.; LEUNG-BULL, J.; MAROTO, F.G. Corn steep liquor as a source of nutrients for ethanologic fermentation by *Bacillus stearothermophilus* t-13. **Bulletin Of The Chemists And Technologists**, Londres, v. 19, p.481-497, out. 2000.
- ANDRADE, L. A. et al. Análise da cobertura de duas fitofisionomias de Caatinga, com diferentes históricos de uso, no município de São João do Cariri, Estado da Paraíba. **Cerne**, Lavras, v. 11, n. 3, p.253-262, out. 2000.
- ANDRADE, P. M. M.; CARMO, M. G. T. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. **Revista de Metabolismo e Nutrição**, v. 8, n. 3, p. 135-143, 2006.
- ANDREOLA, F. A microbiota do solo na agricultura orgânica e no manejo das culturas. **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**, Campinas, p.21-21, 2007.
- ANGERBAUER, C. et al. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3051-3056, 2008.
- ANP. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. <<http://www.anp.gov.br/>>. Acesso em: 12/12/2016.
- ANTUNES, Raquel; SILVA, Inês Cristóvão. O papel dos microorganismos no futuro dos biocombustíveis. **Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI**. 2011. Disponível em: <http://www.marcasepatentes.pt/files/collections/pt_PT/1/300/302/O%20Papel%20dos%20Microorganismos%20no%20futuro%20dos%20Biocombust%3%ADveis.pdfAndgt>. Acesso em: 07 dez. 2016.
- ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 23, n. 3, p.66-75, 2007.

- SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 34
- ASHA, S.; VIDYAVATHI, M.. *Cunninghamella*—a microbial model for drug metabolism studies—a review. **Biotechnology Advances**, India, v. 27, n. 1, p.16-29, 2009.
- BABU, M. et al. Production of Single Cell Protein using *Kluveromyces marxianus* isolated from paneer whey. **International Journal of Biomedical and Advance Research**, v. 5, n. 5, p. 255-257, 2014.
- BAEYENS, J. et al. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 47, p. 60-88, 2015.
- BAGY, M. M. K. et al. Two stage biodiesel and hydrogen production from molasses by oleaginous fungi and *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 7, p. 3185-3197, 2014.
- BHANJA, A. et al. Comparative Studies of Oleaginous Fungal Strains (*Mucor circinelloides* and *Trichoderma reesei*) for Effective Wastewater Treatment and Bio-Oil Production. **Biotechnology Research International**, [s.l.], v. 2014, p.1-7, 2014. Hindawi Publishing Corporation.
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/479370>.
- BORDIM, S. et al. Crescimento microbiano em b0 (diesel), b50 (mistura) e b100 (biodiesel).: Microscópicos e eficientes: importância dos microrganismos no ambiente ruminal. **Revista Brasileira de Zootecias**, [s.l.], p.28-30, 2017.
- BRZEZINSKA-RODAK, M.; KLIMEK-OCHAB, M.; ZYMANCZYK-DUDA, E. Enzyme-mediated protoplast formation of *Cunninghamella echinulata*—preliminary studies. **BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology**, v. 97, n. 1, 2016.
- BURDON, K. L. Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations. **Biotechnology Research International: Journal of Bacteriology**, [s.l.], v. 52, n. 6, p.665-665, 1946.
- CALDER, P. C.; ALBERS, R.; ANTOINE, J. M.; BLUM, S.; BOURDET-SICARD, R.; FERNS, G. A.; LØVIK, M. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. **British Journal of Nutrition**, v. 101, n. S1, p. 1-45, 2009.

- SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 35
- ČERTÍK, M. et al. Enhancement of Nutritional Value of Cereals with γ -Linolenic Acid by Fungal Solid-State Fermentations. **Food Technology & Biotechnology**, v. 44, n. 1, 2006.
- CHRISTOPHER, J. T. et al. Phenotyping novel stay-green traits to capture genetic variation in senescence dynamics. **Functional Plant Biology**, v. 41, n. 11, p. 1035-1048, 2014.
- COLLA, G. et al. Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. **Frontiers In Plant Science**, [s.l.], v. 5, p.448-448, 9 set. 2014. Frontiers Media SA.
<http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00448>.
- CORTES, M. L.; CASTRO, M. M. C.; JESUS, R. P. D; BARROS NETO, J. A. D.; KRAYCHETE, D. C. Therapy with omega-3 fatty acids for patients with chronic pain and anxious and depressive symptoms. **Revista Dor**, v. 14, n. 1, p. 48-51, 2013.
- COSTA NETO, P. R. et al. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, [s.l.], v. 23, n. 4, p.531-537, 2000.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.
- DE BARROS, R. P. Diversidade de fungos em um vertissolo com adição de vinhaça na cultura de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). **Revista Uniabeu**, v. 5, n. 10, p. 181-196, 2012.
- DE PARIS, L. D., SCHEUFELE, F. B., JÚNIOR, A. T., GUERREIRO, T. L., HASAN, S. D. M. *Estudo do crescimento de A. asiellus em farelo de soja convencional para produção de enzimas. Estudos Tecnológicos Em Engenharia*, v. 6, n. 1, p. 22-35, 2010.
- DIEZ, J. C. et al. Batch ethanol fermentation of sugar-cane molasses media by *Zymomonas mobilis*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, n. 2, p. 419-426, 1996.

- SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 36
- DINIZ, J. F.; FAVARETO, A. Os desafios da inclusão da agricultura familiar no mercado de matéria-prima para o biodiesel no Brasil. **Estudos Sociedade e Agricultura**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p.139-187, 2013.
- DONOT, F. et al. Single cell oils (SCOs) from oleaginous yeasts and moulds: production and genetics. **Biomass and Bioenergy**, v. 68, p. 135-150, 2014.
- DOS SANTOS, S. C. et al. Evaluation of substrates from renewable-resources in biosurfactants production by *Pseudomonas* strains. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 35, 2010.
- FAKAS, S. et al. Compositional shifts in lipid fractions during lipid turnover in *Cunninghamella echinulata*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1321-1327, 2007.
- FAKAS, S. et al. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 4, p. 573-580, 2009.
- FELTRIN, V. P. et al. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melaço de cana-de-açúcar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 1, p. 0-0, 2000.
- FERNANDES, A. F. et al. Efeito da substituição parcial da farinha de trigo por farinha de casca de batata (*Solanum tuberosum* Lineu). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 56-65, 2008.
- FERREIRA, S. L. et al. Análise por cromatografia gasosa de BTEX nas emissões de motor de combustão interna alimentado com diesel e mistura diesel-biodiesel (B10). **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 539-545, 2008.
- FONTES, L. C. B. et al. Conservação de maçã minimamente processada com o uso de películas comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 872-880, 2008.
- FRANCISCO, M. R.; SALDANHA, T.; FRAGA, M. E. Fungi as an alternative to produce essential fatty acids. **Científica**, v. 45, n. 2, p. 123-129, 2017.
- GADALLAH, A. E.; DESOUKY, A. E. H.. An effective lipid-producing fungal sp. strain DGB1 and its use for biodiesel production. **African Journal of**

- SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 37
- Biotechnology**, [s.l.], v. 12, n. 34, p.5347-5353, 21 ago. 2013. Academic Journals. <http://dx.doi.org/10.5897/ajb2013.12457>.
- GADALLAH, A. E.; DESOUKY, A. E. H.. Promising oleaginous filamentous fungi as biodiesel feed stocks: Screening and identification. **Journal of Experimental Biology**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.576-582, 2014.
- GAO, D. et al. Microbial lipid production from xylose by *Mortierella isabellina*. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 315-321, 2013.
- GARAY, L. A. et al. Eighteen new oleaginous yeast species. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 43, n. 7, p. 887-900, 2016.
- GIONGO, P. et al. Diversidade cariotípica de "*Astyanax asuncionensis*" (Teleostei, Characiformes) na microbacia do rio Sepotuba (Alto Paraguai). DOI: 10.7902/ecb.v3i2.9. **Evolução e Conservação da Biodiversidade**, v. 3, n. 2, p. 53-58, 2013.
- HARISH, B. S.; RAMAIAH, M. J.; UPPULURI, K. B. Bioengineering strategies on catalysis for the effective production of renewable and sustainable energy. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 51, p.533-547, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.06.030>.
- HAWKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D.N. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. 9 Ed. CAB Bioscience, Egham, 2001. 650p.
- HIBBETT, D. S.; OHMAN, A.; GLOTZER, D.; NUHN, M.; KIRK, P.; NILSSON, R. H. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. **Fungal Biology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 38-47, 2011.
- IMURA, Y. et al. Microglia release ATP by exocytosis. **Glia**, v. 61, n. 8, p. 1320-1330, 2013.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapas de biomas e vegetação**. Rio de Janeiro, 2005. Disponível em.: <http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 12/12/2016.

- SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 38
- IYAYI, E. A.; ADEROLU, Z. A. Enhancement of the feeding value of some agro-industrial byproducts for laying hens after their solid state fermentation with *Trichoderma viride*. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 182-185, 2004.
- JEENNOR, S. et al. Comparative fatty acid profiling of *Mucor rouxii* under different stress conditions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 259, n. 1, p. 60-66, 2006.
- LEUNG, B. O.; BRASH, J. L.; HITCHCOCK, A. P.. Characterization of Biomaterials by Soft X-Ray Spectromicroscopy. **Materials**, [s.l.], v. 3, n. 7, p.3911-3938, 6 jul. 2010. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ma3073911>.
- LEUNG, D. Y.; WU, X.; LEUNG, M. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, [s.l.], v. 87, n. 4, p.1083-1095, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.10.006>.
- LI, Shi Lin et al. Biodiversity of the oleaginous microorganisms in Tibetan Plateau. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 43, n. 2, p.627-634, jun. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822012000200026>.
- LI, Y.; ZHAO, Z. BAI, F. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 41, n. 3, p.312-317, ago. 2007.
- LIMA, L. R.; ALMEIDA, P. F.; MATOS, J. B. T. L.. Prospecção de técnicas moleculares (qpcr e fish) a serem utilizadas em amostras ambientais para pesquisa na área de biotecnologia. **Cadernos de Prospecção**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.79-91, 30 mar. 2016. Universidade Federal da Bahia. <http://dx.doi.org/10.9771/s.cprosp.2016.009.010>.
- LIU, B.; ZHAO, Z. K.. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n. 8, p. 775-780, 2007.
- LOPES, D. O. P.; DINARDO-MIRANDA, L. L.; BUSOLI, A. C. **Atualidades em pragas da cultura da cana-de-açúcar: sudeste e nordeste do Brasil**. In: BUSOLI, A. C.; FRAGA, D. F.; SANTOS, L. C.; ALENCAR, J. R. D. C. C.;

- SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 39
- GRIGOLLI, J. F. J.; JANINI, J. C.; SOUZA, L. A.; VIANA, M. A.; FUNICHELLO, M. Tópicos em Entomologia Agrícola, Jaboticabal: Multipress, 47-64p. 2011.
- LOPES, J. C. **Produção e caracterização físico-química de quitosana extraída de isolados de *Cunninghamella sp.*** 2016. (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal do Tocantins, Tocantins.
- LOURINHO, G.; BRITO, P. Advanced biodiesel production technologies: novel developments. **Reviews In Environmental Science And Bio/technology**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.287-316, 21 dez. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11157-014-9359-x>.
- LUSTOSA, K. R. et al. Microbial β -glycosylation of entacapone by *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245. **Journal Bioscience Bioengineering**, [s.l.], v. 113, n. 5, p.611-613, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.01.004>.
- M.LOPES, M. F.; MESSIANO, G. B.; NARDI, C. P. P. Biotransformação do glicerol por espécie de *aspergillus*. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, São Paulo, v. 6, n. 1, p.08-14, 2017.
- MALAJOVICH, M. A. **Biociencia 2011**. Rio de Janeiro: Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia Ort, 2012. 301 p.
- MARANGON, G. P. et al. Análise de agrupamento de espécies lenhosas da Caatinga no Estado do Pernambuco. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 36, n. 88, p. 347-353, 2017.
- MARINHO, N.F. et al., Respostas de *Acacia mangium* Willd e *Sclerolobium paniculatum* Vogel a fungos micorrízicos arbusculares nativos provenientes de áreas degradadas pela mineração de bauxita na Amazônia. **Acta Bot. Bras.**, 18:141-149, 2004.
- MASIERO, G.; LOPES, H. Ethanol and biofuels as alternatives energetic sources: Latin-American e Asian perspectives. **Revista Brasileira de Política Internacional**, v. 51, n. 2, p. 60-79, 2008.
- MEEUWSE, P. et al. Lipids from yeasts and fungi: tomorrow's source of biodiesel? **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 7, n. 5, p. 512-524, 2013.

- SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 40
- MELLO, C. M. A. et al. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in an area of Caatinga, PE, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 4, p. 938-943, 2012. MAIA et al.; 2002;
- MELO, A. S; SAMPA. I., Y. S. B. Uma Nota Sobre o Impacto do Preço do Açúcar, do Etanol e da Gasolina na Produção do Setor Sucroalcooleiro. **Revista Brasileira de Economia**, Rio de Janeiro, v. 70, n. 1, p. 61-69, 2016.
- MENEZES, R. S. C. et al. Biogeochemical cycling in terrestrial ecosystems of the Caatinga Biome. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 643-653, 2012.
- MENG, X. et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 2009.
- MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA (MME). M. d M. E., 2015. **Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel**. Acesso em: 25 jan. 2017.
- MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO (MDA). O que é o programa nacional de produção e uso do biodiesel (PNPB). Acesso em: 25 jan. 2017.
- MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO (MDA). O selo combustível social. Acesso em: 25 jan. 2017.
- MORALES, D. K. et al. Control of *Candida albicans* Metabolism and Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* Phenazines. **Mbio**, [s.l.], v. 4, n. 1, jan. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.00526-12>.
- MOREIRA, F. M. S. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Ufla, 2006. 729 p.
- MORETON, R. S. Physiology of lipid accumulating yeasts. **Single cell oil**, p. 1-32, 1988.
- MOTTA, V.T. **Bioquímica Básica**. Cap. 9: Lipídeos e Membranas. Laboratório Autolab Ltda. Disponível em: <<http://www.laboratorioautolab.com>>, Acesso em: 12/12/2016.

- SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 41
- MUBARAK, M.; SHAIJA, A.; SUCHITHRA, T. V. A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. **Algal Research**, v. 7, p. 117-123, 2015.
- NANGUL, A.; BHATIA, R. Microorganisms: a marvelous source of single cell proteins. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 3, n. 1, p. 15, 2013.
- NEEMA, P.M., KUMARI, A. Isolation of lipid producing yeast and fungi from secondary sewage sludge and soil. **Aus. J. Basic Appl. Sci.**, 7(9): 283 288; 2013
- OCED, FAO. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2011-2020**. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Publishing. 2011.
- OLIVEIRA, L. R.; BATISTA, R. D. Perspectivas e situação atual da produção de biocombustíveis. **Revista Eletrônica de Energia**, Tocantins, v. 5, n. 1, p.32-42, 2015.
- OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. **Multi Ciência**, São Paulo, n.7, p. 1-19, out. 2006.
- PACCHIONI, R. G. et al. Taxonomic and functional profiles of soil samples from Atlantic forest and Caatinga biomes in northeastern Brazil. **MicrobiologyOpen**, v. 3, n. 3, p. 299-315, 2014.
- PALUDO, C. R. et al. Microbial transformation of β -lapachone to its glycosides by *Cunninghamella elegans* ATCC 10028b. **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 4, p. 657-661, 2013.
- PALUDO, G. B. Micro-organismos geneticamente modificados e sua relação com o aumento na produção de biocombustíveis. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 10, n. 18, 2014.
- PEREIRA JÚNIOR, L. R.; ANDRADE, A.P de; ARAÚJO, K. D. Composição florística e fitossociológica de um fragmento de caatinga em Monteiro, PB. **Revista Holos**, v. 28, p. 73-87, 2012.

- SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 42
- PUPIN, A. M. et al. Total lipids and fatty acids of strains of *Metarhizium anisopliae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 121-128, 2000.
- RATLEDGE, C. Microbial Production of gamma-Linolenic Acid. **Handbook Of Functional Lipids**, [s.l.], p.19-45, 18 jul. 2005. Informa UK Limited.
<http://dx.doi.org/10.1201/9781420039184.ch2>.
- RATLEDGE, C. Microorganisms for lipids. **Acta Biotechnologica**, v. 11, n. 5, p. 429-438, 1991.
- RATLEDGE, C. Single cell oils — have they a biotechnological future? **Trends In Biotechnology**, [s.l.], v. 11, n. 7, p.278-284, jul. 1993. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/0167-7799\(93\)90015-2](http://dx.doi.org/10.1016/0167-7799(93)90015-2).
- RATLEDGE, C.; WYNN, J. P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. 51. ed. London: **Advances In Applied Microbiology**, 2002. 52 p.
- REINEHR, C. O. et al. Produção de lipases com atividade de hidrólise por *Aspergillus* utilizando subprodutos agroindustriais, óleo de soja e glicerol. **RECEN-Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 18, n. 1, p. 97-115, 2016.
- RICO, J. A. P.; SAUER, I. L. A review of Brazilian biodiesel experiences. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 513-529, 2015.
- ROCHA, A. M. et al. Estudo de indicadores das pesquisas acadêmicas em biotecnologia nas regiões brasileiras: uma visão em torno da bioeconomia. **RDE-Revista de Desenvolvimento Econômico**, v. 17, n. 32, 2016.
- SANTA IZABEL, T. S. et al. Fungos conidiais do bioma Caatinga II. Novos registros para o continente americano, Neotrópico, América do Sul e Brasil. **Rodriguésia-Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 62, n. 2, 2011.
- SANTIAGO, A. L. C. M. de et al. Mucorales from the semiarid of Pernambuco, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 299-305, 2013.

- SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 43
- SANTOS, R. V. et al. Composição química da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e das silagens com diferentes aditivos em duas idades de corte. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1184-1189, 2006.
- SARRIS, D. et al. Production of added-value metabolites by *Yarrowia lipolytica* growing in olive mill wastewater-based media under aseptic and non-aseptic conditions. **Engineering In Life Sciences**, [s.l.], p.1-39, jan. 2017. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/elsc.201600225>.
- SBC – Sociedade Brasileira de Cardiologia (2016). Disponível em: <<http://socios.cardiol.br/2014/20160119-cardiometro.asp>> (Acesso em 01 Set. 2016).
- SCHISTEK, H. Caatinga: um bioma exclusivamente brasileiro e o mais frágil. **Revista do Instituto de Humanitas Unisinos**, v. 389, p. 1-60, 2012.
- SHIFERAW, B. et al. Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. **Food Security**, v. 3, n. 3, p. 307, 2011.
- SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Guanabara Koogan, 2004.
- SILVA, N. R. A. et al. Biosurfactante e Bioemulsificador Produzido por uma *Cunninghamella echinulata* Promissora Isolada do Solo de Caatinga no Nordeste do Brasil. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 15, n. 9, p.15377-15395, 1 set. 2014.
- SILVEIRA, E. S.; LOBATO, R. C.; ABREU, P. C. Fungos e leveduras no estuário da Lagoa dos Patos e praia do Cassino, Rio Grande, RS, Brasil. **Atlântica (rio Grande)**, [s.l.], v. 35, n. 1, p.45-54, 2014. Instituto de Oceanografia - FURG. <http://dx.doi.org/10.5088/atl.2013.35.1.45>.
- SOARES, I. A. et al. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 700-705, 2010.
- SOLOMON, B. D. et al. Policies for the sustainable development of biofuels in the pan American region: a review and synthesis of five countries. **Environmental management**, v. 56, n. 6, p. 1276-1294, 2015.

- SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 44
- SOLOMON, D. A. et al. Frequent truncating mutations of STAG2 in bladder cancer. **Nature genetics**, v. 45, n. 12, p. 1428-1430, 2013.
- SOUZA, Carlos A. F. et al. Coprophilous Mucorales (ex Zygomycota) from three areas in the semi-arid of Pernambuco, Brazil. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 48, n. 1, p.79-86, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.008>.
- STROPARO, S. M. et al. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 6, p.2267-2278, 2012.
- TEHLIVETS, O.; SCHEURINGER, K.; KOHLWEIN, S. D. Fatty acid synthesis and elongation in yeast. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, [s.l.], v. 1771, n. 3, p.255-270, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.004>.
- THLIVEROS, P.; KIRAN, E. U.; WEBB, C. Microbial biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous biomass. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 181–187, 2014.
- TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 12ª Edição. Artmed Editora, 2016.
- VALDUGA, E. et al. Pre-tratamentos de melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para a bioprodução de carotenoides. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1860, 2007.
- VERAS, L. R. V.; POVINELLI, J. A vermicompostagem do lodo de lagoas de tratamento de efluentes industriais consorciada com composto de lixo urbano. **Revista Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 9, n. 3, set., p. 7, 2004.
- VICENTE, G.L. et al., Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 22–27, 2009.
- VILLELA, L. M.; GOMES, F. E.; MELÉNDEZ, J. G. V. Tendência da mortalidade por doenças cardiovasculares, isquêmicas do coração e

- SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 45
- cerebrovasculares. **Revista de enfermagem UFPE on line-ISSN: 1981-8963**, v. 8, n. 9, p. 3134-3141, 2014.
- VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica: A Vida em Nível Molecular**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2014. 1171 p.
- XIONG, W. et al. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 1, p. 29-36, 2008.
- XUE, F. et al. A new method for preparing raw material for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 7, p. 1699-1702, 2006.
- ZEN, C. K. et al. Indução da síntese de lipídeos e proteínas por *Aspergillus niger*. **Revista CIATEC-UPF**, v. 6, n. 2, p. 40-47, 2014.
- ZHAO, X. et al. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 5, p. 405-412, 2008.
- ZILLI, J. E. et al., Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, set-dez. 2003.
- ZUCOLOTO, G. F.; FREITAS, R. E. Propriedade intelectual e aspectos regulatórios em biotecnologia. Rio de Janeiro: **Ipea**, 2013. 240 p.

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 46

CAPÍTULO II

Artigo aceito e publicado na revista **ENGEVISTA** em dezembro de 2017.

PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE BIOMASSA E LIPÍDEOS UTILIZANDO MEIOS CONTENDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS POR *Mucor subtilissimus* (UCP/WFCC 1262), *Cunninghamella echinulata* (UCP/WFCC 1299) E *Rhizopus microsporus* (UCP/WFCC 1304) ISOLADOS DO SOLO DA CAATINGA DE PERNAMBUCO

Miller da Costa Lima¹ Tayane de Cássia Dias Mendes Silva³ Adriana Ferreira de Souza² Marcos Antônio Cavalcanti Luna² Rosileide Fontenele Silva Andrade¹ Carlos Alberto Alves da Silva¹ Kaoru Okada¹

1 UNICAP – Universidade Católica de Pernambuco 2 UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco 3 UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

Resumo: A produção de lipídeos microbianos oferece vantagens em relação aos vegetais e animais, apresentando rápida geração, não necessitando de grandes áreas de terra arável e tendo melhor controle da produção e do produto. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi realizar uma seleção de fungos Mucorales (*Mucor subtilissimus* UCP/WFCC 1262, *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299 e *Rhizopus microsporus* UCP/WFCC 1304), isolados do solo da Caatinga de Pernambuco em meio contendo resíduos agroindustriais na produção de lipídeos. O cultivo foi realizado utilizando diferentes concentrações de melão de cana de açúcar, milhocina e pH. A linhagem *C. echinulata* demonstrou elevado potencial de produção de biomassa e lipídeos em diferentes níveis, a partir do meio selecionado, utilizando planejamento fatorial 2³. Os rendimentos das biomassas foram calculados por gravimetria, os lipídeos totais quantificados após extração por clorofórmio e metanol e a identificação dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa (GC). Adicionalmente, um estudo histoquímico foi realizado com o fungo selecionado. Os resultados obtidos demonstraram que *Cunninghamella echinulata* foi o micro-organismo selecionado devido a elevada produção simultânea de biomassa (9,05g/L) e lipídeos totais (46,96%) em meio constituído por 10% de melão de cana de açúcar e 5% de milhocina, com o pH 6. A partir deste meio selecionado foi realizado um planejamento fatorial 2³ para cultivo com a *Cunninghamella echinulata* visando obter a máxima produção de biomassa e lipídeos totais. De acordo com o planejamento o meio constituído por milhocina (8%), melão de cana de açúcar (12%) e pH 6.0 (ensaio 4), foi obtida a máxima concentração de biomassa (10,1g/L) e lipídeos totais (47,86%). A partir da biomassa de *Cunninghamella echinulata* cultivada no meio selecionado do planejamento fatorial foi observado o máximo acúmulo de lipídeo no micélio, confirmando os resultados obtidos neste estudo para a produção de lipídeos.

Palavras-Chave: 1 Biomassa, 2 Lipídeos, 3 Resíduos agroindustriais, 4 Mucorales.

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 48

Abstract: The production of microbial lipids offers advantages over plants and animals, presenting rapid generation, not requiring large areas of arable land and having better control of production and product. In this sense, the objective of this work was to carry out a selection of mucorial fungi (*Mucor subtilíssimus* UCP / WFCC 1262, *Cunninghamella echinulata* UCP / WFCC 1299 and *Rhizopus microsporus* UCP / WFCC 1304) isolated from the Caatinga soil of Pernambuco in a medium containing agroindustrial residues. The cultivation was carried out in different concentrations of sugar cane molasses, cornicine and pH. The lineage with high potential to produce biomass and lipids was cultivated at different levels, from the selected medium, using factorial design 2³. The biomass yields were calculated by gravimetry, the total lipids quantified after extraction by chloroform and methanol and the identification of the fatty acids was performed by gas chromatography (GC). In addition, a histochemical study was performed with the selected fungus. The results showed that *Cunninghamella echinulata* was the selected microorganism due to the high simultaneous production of biomass (9.05g / L) and total lipids (46.96%) in a medium constituted by 10% sugar cane molasses and 5 % Of cornicine at pH 6. From this selected medium a factorial planning 2³ was carried out for cultivation with *Cunninghamella echinulata* aiming at obtaining the maximum production of biomass and total lipids. According to the planning, cornicine (8%), sugarcane molasses (12%) and pH 6.0 (test 4) were the highest concentrations of biomass (10.1g / L) and total lipids (47.86%). From the biomass of *Cunninghamella echinulata* cultivated in the selected medium of factorial planning the maximum accumulation of lipid in the mycelium was observed, confirming the results obtained in this study for the production of lipids.

Keywords: 1 Biomass, 2 Lipids, 3 Agroindustrial wastes, 4 Mucorales.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de micro-organismos em bioprocessos submersos ou sólidos têm a finalidade de produzir bioprodutos aplicáveis em diversos setores industriais. Assim, os estudos com a obtenção de lipídeos e proteínas por via microbiana vêm crescendo, pela grande variedade de produtos obtidos e elevados rendimentos econômicos (Soares et al., 2010; Zen et al., 2014; Reinehr, 2016).

Uma eficiente alternativa que vem sendo bastante pesquisada é a produção de moléculas com características eficientes para a produção de biocombustíveis. Os micro-organismos são capazes de produzir biocombustíveis tais como o bioetanol, biodiesel, e biogás, que vem sendo bastante utilizados no cenário mundial. Devido a ser uma energia vantajosa, não provocar impactos ambientais e não produzir materiais perigosos, caracterizando-se como um processo limpo (Antunes; Silva, 2011; Oliveira; Batista, 2015).

Assim, a produção de biomassa fúngica utilizando resíduos agroindustriais como fontes de carbono e nitrogênio, é considerada viável na produção simultânea de bioprodutos como lipídeos e enzimas (De paris et al., 2010; Zen et al., 2014).

Por sua vez, os substratos de origem agroindustrial são considerados promissores nos processos fermentativos, tanto por via submersa, como em estado sólido. Portanto, os resíduos agroindustriais vêm sendo empregados como fontes carbono e nitrogênio favorecendo o crescimento microbiano e a produção de metabólitos secundários (Makkar; Cameotra; Banat, 2011).

Portanto, a substituição de nutrientes sintéticos por fontes renováveis como glicerol, melão de cana de açúcar, óleos pós-fritura, milhocina e materiais lignocelulósicos são explorados e contribuem favoravelmente para a redução dos custos de produção e a minimização do descarte de resíduos agroindustriais (Cerqueira et al., 2010; Imura et al., 2013).

Os lipídeos microbianos são importantes bioprodutos de fungos, em termos de estrutura, constituição da membrana, retículo endoplasmático e das membranas de várias organelas; substâncias de reserva, principalmente em forma de triglicerídeos. Muitos estudos têm demonstrado a importância de lipídeos microbianos para o desenvolvimento, esporulação e germinação e seu envolvimento em vários processos fisiológicos (Putzke, Putzke, 2004; Pupin et al., 2000; Gao et al, 2013).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados foram *Mucor subtilissimus* UCP/WFCC 1262, *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299 e *Rhizopus microsporus* UCP/WFCC 1304 isolados de amostras do solo da Caatinga. As linhagens encontram-se mantidas no Banco de Culturas UCP (Universidade Católica de Pernambuco), registrado no World Federation for Culture Collection (WFCC).

2.2 Resíduos Agroindustriais

Os resíduos utilizados foram o melão de cana-de-açúcar procedente do processo de fabricação de aguardente de cana de açúcar, gentilmente cedido pela Destilaria Campo Bello, (Fazenda Montevidéu, S/N, Zona Rural – Amaraji/PE) e milhocina obtida a partir do processo de refinação do milho, gentilmente cedido pela indústria Brasil Ingrediente Ltda, (localizada em Cabo de Santo Agostinho - PE).

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 50

2.3 Condições de cultivo

As linhagens *M. subtilissimus* UCP/WFCC 1262, *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299 e *R. microsporus* UCP/WFCC 1304 foram crescidas no meio Batata Dextrose Agar (BDA) (0,3g/L de caldo de batata, 20g/L de dextrose, 18g/L de Agar) com pH 5,5 e incubadas a 28°C, durante 96 h. Após esse período, os esporângios foram transferidos para água destilada esterelizada e em seguida, foi determinado o número de esporângios em câmara de Neubauer (10^7 esporos/mL). Esta suspensão foi utilizada como inóculo.

2.4 Produção de biomassa e lipídeos

A produção de biomassa e lipídeos foi realizada em frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meios constituídos por diferentes concentrações de milhocina, melão de cana-de-açúcar e diferentes pH de acordo com os ensaios preliminares (Tabela 1). Em todos os ensaios foram adicionados 1% do inóculo contendo 10^7 esporos/mL. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150 rpm, durante 96 h, à temperatura de 28°C. Após este período, foram filtrados para separação do líquido metabólico e biomassa. O Synthetic Medium for Mucorales-SMM (Hesseltine e Anderson, 1957) foi utilizado como controle.

Tabela 1 – Ensaios preliminares, contendo diferentes níveis de melão de cana de açúcar e milhocina para a produção de biomassa e lipídeos

| Ensaios | Milhocina (%) | Melão de cana de açúcar (%) |
|---------|---------------|-----------------------------|
| 1 | 5 | 5 |
| 2 | 5 | 10 |
| 3 | 10 | 5 |
| 4 | 10 | 10 |

2.5 Obtenção da biomassa fúngica

A massa micelial foi obtida por filtração (filtro com 120 mesh), lavada com água destilada, e em seguida, liofilizada e transferida para o dessecador até peso constante e o rendimento expresso em g/L.

2.6 Avaliação histoquímica através de Sudan Black

As amostras de *M. subtilissimus* UCP/WFCC 1262, *C. echinulata* UCP/WFCC 1299 e *R. microsporus* UCP/WFCC 1304 foram lavadas com solução tampão fosfato PBS, fixadas em paraformaldeído (37%) por 1 h, pH 7,2. Em seguida, lavadas em tampão fosfato (PBS) e imersas no corante Sudan Black por 10 min, na ausência de luz. Posteriormente, foi retirado o

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 51

excesso do corante em álcool a 70% e com água destilada estéril. Após a coloração em Sudan Black as amostras foram contra coradas com safranina a 0,5% por 30 seg, em seguida foi utilizada a solução de PBS para a remoção do excesso de safranina. Por fim as amostras foram observadas por microscopia e os corpos lipídicos foram fotografados em lentes objetivas de até 100x.

2.7 Extração de lipídeos totais

Os lipídeos totais foram extraídos pelo método de Manocha et. al., (1980), onde utilizando 1g de biomassa e um sistema de solventes clorofórmio:metanol (2:1; 1:1; 1:2 v/v) empregando extrações sucessivas. Os extratos foram obtidos por agitação por 15 min, posteriormente centrifugados a 5000g, por 10 min e a biomassa submetida a uma nova extração. Os extratos foram reunidos e evaporados à vácuo. Em seguida a produção de lipídeos foi calculada em relação a biomassa inicial e o teor de lipídeos (g L^{-1}) ou lipídeos totais (%), de acordo com a equação abaixo:

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

2.8 Metilação dos lipídeos

A metilação dos ácidos graxos foi realizada de acordo com Durham e Kloos (1978), a partir de 10 mg de biomassa seca adicionada de 3 mL da solução de trifluoreto de boro metanol a 14% e 3ml de hexano, sendo este último removido e evaporado em atmosfera de nitrogênio. Os ácidos graxos convertidos em ésteres de metila foram suspensos em n-hexano.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de biomassa e lipídeos totais por fungos da ordem mucorales

As linhagens de Mucorales (*M. subtilissimus* UCP/WFCC 1262, *C. echinulata* UCP/WFCC 1299 e *R. microsporus* UCP/WFCC 1304), foram investigados quanto ao potencial na produção de biomassa e lipídeos totais. De acordo com os resultados obtidos (tabela 2), foi possível concluir que a *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299 demonstrou maior potencial de produção de biomassa (9,05g/L) e lipídeos totais (46,96%) no ensaio 2, (consituído por 10% de melação de cana-de-açúcar e 5% de milhocina, com o pH 6).

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 52

Tabela 2 – Seleção por (*M. subtilissimus* UCP/WFCC 1262, *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299 e *Rhizopus microsporus* UCP/WFCC 1304) com maior produção de biomassa e lipídeos totais.

| Micro-organismos | Ensaio | Biomassa (g/L) | Lipídeos totais (%) |
|----------------------------------|--------|----------------|---------------------|
| <i>M. subtilissimus</i> | 1 | 0,35 | ND |
| | 2 | 3,55 | ND |
| | 3 | 1,9 | ND |
| | 4 | 1,4 | ND |
| <i>Cunninghamella echinulata</i> | 1 | 7,3 | 20,54 |
| | 2 | 9,05 | 46,96 |
| | 3 | 7,8 | 25,64 |
| | 4 | 5,85 | 8,54 |
| <i>R. microsporus</i> | 1 | 5,6 | 4,5 |
| | 2 | 5,75 | 7 |
| | 3 | 5,55 | 4 |
| | 4 | 5,3 | 2 |

ND: Não detectado*

3.2 Estudo histoquímico de lipídeos em *M. subtilissimus* UCP 1262, *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299 e *R. microsporus* UCP 1304 utilizando o método de Sudan Black B

Burdon (1946) descreveu pela primeira vez a coloração de corpos lipídicos em fungos usando o corante Sudan Black, sendo ultimamente utilizado para analisar esses compostos nas células como uma análise qualitativa, visando investigar micro-organismos oleaginosos (Prasanna et al., 2011; Neema et al., 2013).

De acordo com a figura 1 A, é possível verificar que a *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299 crescida no meio contendo os substratos alternativos, milhocina e melaço de cana-de-açúcar (MCM) apresentou o maior acúmulo notável de lipídeos no micélio, verificado pelo aparecimento da coloração roxa/azul escura pelo corante lipofílico Sudan Black, por outro lado é possível notar que a mesma crescida no meio de cultura (SMM) (Controle), houve o acúmulo de lipídeos, porém em menor quantidade.

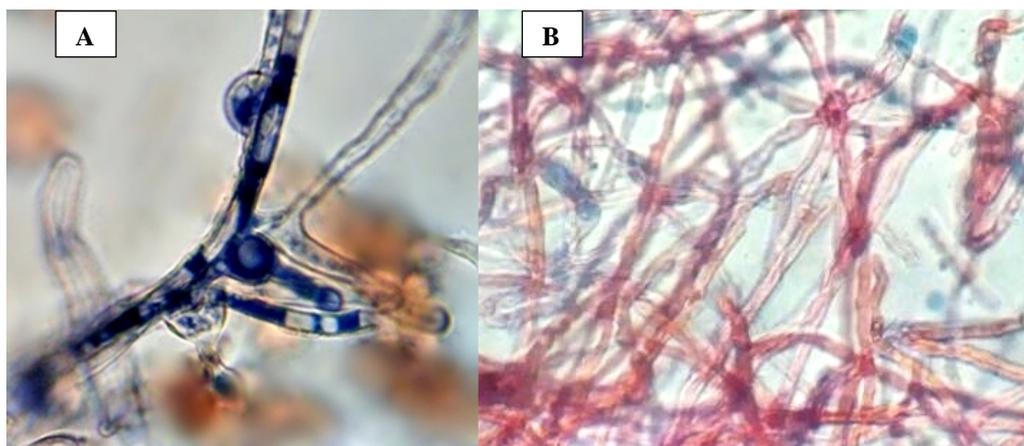


Figura 1 - A - Estudo histoquímico do micélio da *C. echinulata* UCP/WFCC 1299 nos meios de culturas (MCM) - A – (MCM) e (SMM) - B.

A partir dos resultados do teste histoquímico chegamos à conclusão por uma avaliação qualitativa que a *C. echinulata* UCP 1299 foi o melhor produtor de lipídeos em relação aos demais, tendo como a próxima etapa fazer um planejamento fatorial 2^3 com o mesmo para determinar a melhor condição de produção, e quantificação dos lipídeos totais.

3.3 Produção de biomassa e lipídeos totais por *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299 utilizando planejamento fatorial 2^3

A partir do meio selecionado (5% milhocina e 10% melão de cana-de-açúcar), (Tabela 2), foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 com variações das concentrações de milhocina, melão de cana de açúcar e pH com variável resposta produção de biomassa e lipídeos totais por *C. echinulata* UCP/WFCC 1299 (Tabela 3). Os resultados obtidos demonstraram que a máxima produção de biomassa (10,1g/L) e lipídeos totais (47,86%) ocorreu na condição 4 em meio constituído por melão de cana de açúcar (12%), milhocina (8%) e pH 5. Os rendimentos de biomassa (6,9g/L) e lipídeos (25,1%) descritos por Bellou *et al.*, (2012) utilizando a *C. echinulata* ATHUM 4411 cultivada em meio contendo glicerol como fonte de carbono foi inferiores aos obtidos no presente estudo.

Tabela 3 - Produção de biomassa e lipídeos totais por *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299 em meio contendo diferentes níveis de milhocina, melão de cana de açúcar e pH, a partir do planejamento fatorial 2^3

| Ensaio | Milhocina (%) | Melão de cana (%) | pH | Biomassa (g/L) | Lipídeos totais (%) |
|--------|---------------|-------------------|-----|----------------|---------------------|
| 1 | 2 | 8 | 5.0 | 4,7 | 27,58 |
| 2 | 2 | 12 | 5.0 | 2,0 | 20,00 |

| | | | | | |
|-----------|---|----|-----|------|-------|
| 3 | 8 | 8 | 5.0 | 4,1 | 24,70 |
| 4 | 8 | 12 | 5.0 | 10,1 | 47,86 |
| 5 | 2 | 8 | 7.0 | 1,7 | 14,82 |
| 6 | 2 | 12 | 7.0 | 2,4 | 27,28 |
| 7 | 8 | 8 | 7.0 | 1,3 | 17,40 |
| 8 | 8 | 12 | 7.0 | 2,1 | 19,52 |
| 9 | 5 | 10 | 6.0 | 2,6 | 26,08 |
| 10 | 5 | 10 | 6.0 | 2,3 | 18,60 |
| 11 | 5 | 10 | 6.0 | 2,7 | 25,54 |
| 12 | 5 | 10 | 6.0 | 4,4 | 23,80 |

3.4 Efeito da milhocina, melação de cana de açúcar e pH, na produção de biomassa e lipídeos totais por *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299

O diagrama de Pareto apresentado na Figura 1, com o grau de confiança de 95%, demonstra o efeito das concentrações de melação de cana-de-açúcar, milhocina e pH, assim como suas interações, na produção de biomassa e lipídeos totais por *C. echinulata* UCP/WFCC 1299.

Para a produção de biomassa, a Figura 1A demonstrou que as três variáveis influenciaram no aumento de produção da biomassa, do ponto de vista estatístico. No entanto, o pH e a associação entre melação de cana de açúcar e milhocina foram quem mais influenciou no aumento da produção de biomassa. Por outro lado, a Figura 1B mostra que as três variáveis foram significativas para a produção. Porém, o elevado rendimento de lipídeos foi mais significativo estatisticamente devido as concentrações de melação de cana de açúcar estudadas neste trabalho.

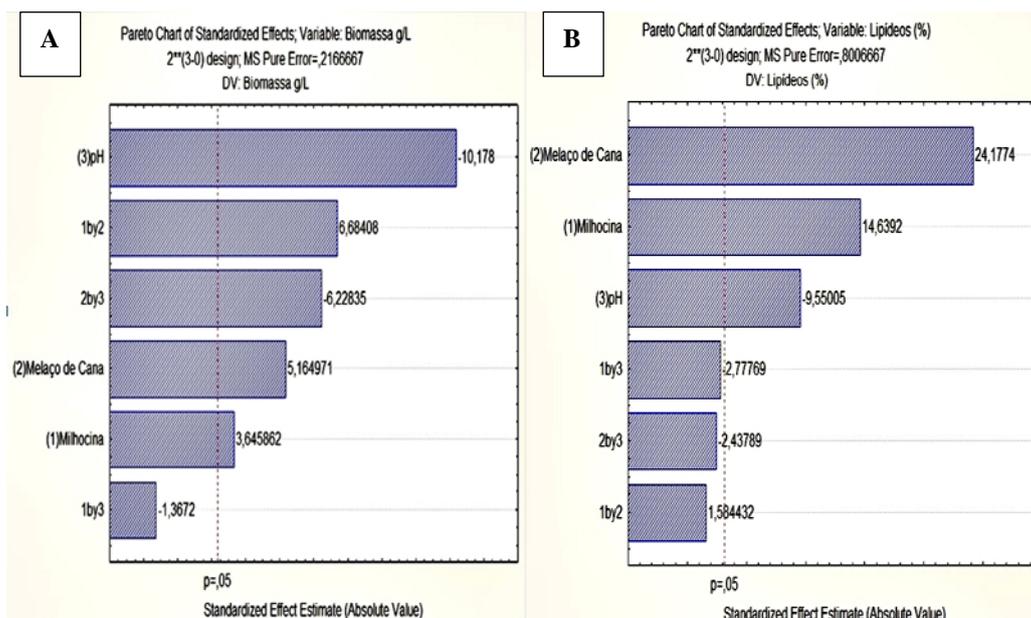


Figura 2 - Diagrama de pareto para análise do melão de cana de açúcar, milhocina e pH na produção de biomassa (A) e lipídeos totais (B) por *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299

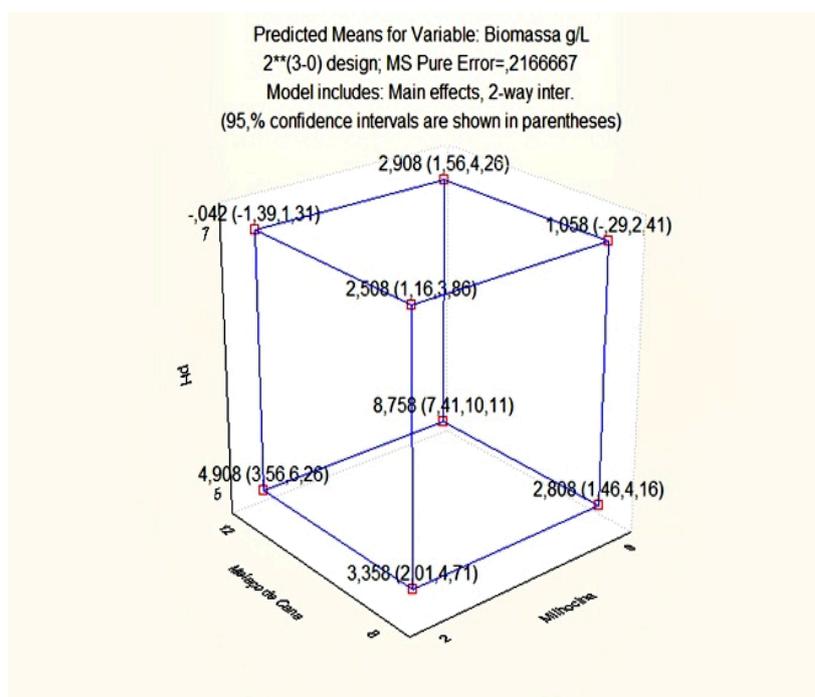


Figura 3 - Gráfico de Cubo para análise das interações do melão de cana-de-açúcar, milhocina e pH na produção da biomassa por *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299

Para a produção de biomassa, a figura 2 demonstrou que a interação da máxima concentração de melão de cana-de-açúcar 12%, e milhocina 8% foram significativas para a máxima produção de biomassa. No entanto a interação da mínima concentração do pH 5, e a

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 56
 máxima concentração de melação de cana-de açúcar 12% também influenciou na máxima produção da biomassa.

3.5 Caracterização dos ácidos graxos

3.5.1 Cultivo em Meio Sintético para Mucorales (Synthetic Medium for Mucorales) e em meio de substratos alternativos

Os resultados obtidos com a extração e metilação dos ácidos graxos da biomassa seca da *C. echinulata* UCP/WFCC 1299 cultivada em meio sintético para Mucorales, e em meio constituído de substratos alternativos (Milhocina+Melação de cana-de-açúcar - MCM) podem ser analisados na Tabela 4.

Na Tabela 4, apresenta a concentração de ácidos graxos extraído da biomassa de *C. echinulata* UCP/WFCC 1299 cultivada em meio sintético (Synthetic Medium for Mucorales – SMM) e em meio de substratos alternativos, constituído de melação de cana-de-açúcar a 12% e milhocina a 8% - MCM, em temperatura de 28° C e pH de 5.

Tabela 4. Composição de ácidos graxos identificados no lipídeo extraído da biomassa seca de *C. echinulata* UCP/WFCC 1299, cultivada em meio sintético para Mucorales - SMM e meio de substratos alternativos - MCM, em 28° C e pH 5, por 96h.

| Ácidos graxos | SMM | MCM |
|---|---------|--------|
| Ácido palmítico (C _{16:0}) | 19,97 % | 21,17% |
| Ácido esteárico (C _{18:0}) | 4,51 % | 10,62% |
| Ácido behênico (C _{22:0}) | 1,94 % | 3,09% |
| Ácido nervônico (C _{24:0}) | 1,99 % | ND |
| Ácido palmitoléico (C _{16:1}) | 1,40 % | 2,14% |
| Ácido oléico (C _{18:1}) | 42,26 % | 27,98% |
| Ácido linoléico (C _{18:2}) | 11,57 % | 25,42% |
| Ácido linolênico (C _{18:3}) | 2,21 % | 2,13% |
| Ácido graxo não identificado | 14,14 % | 7,45% |

ND: Não detectado*

Como observado na Tabela 4, os maiores picos alcançados nas análises cromatográficas dos ácidos graxos da *C. echinulata* UCP/WFCC 1299 cultivada em glicose - SMM, foram do ácido oléico (C_{18:1}) seguido do ácido palmítico (C_{16:0}) e do linoléico (C_{18:2}).

O cultivo do fungo *C. echinulata* UCP/WFCC 1299 em melaço de cana-de-açúcar a 12% e milhocina a 8% - MCM, em temperatura de 28° C e pH de 5, por 96h, verificou-se a presença dos seguintes ácidos graxos: Ácido palmítico (C_{16:0}), Ácido esteárico (C_{18:0}), Ácido behênico (C_{22:0}), Ácido palmitoléico, Ácido oléico (C_{18:1}), Ácido linoléico (C_{18:2}) e Ácido linolênico (C_{18:3}). Os maiores percentuais observados nas análises cromatográficas foram dos ácidos oléico, linoléico e palmítico. Este perfil de ácidos graxos se assemelha aos dos óleos convencionalmente utilizados para a produção de biodiesel (carvalho et al., 2013).

Em nosso estudo obtivemos 42,26 % de ácido oléico, portanto nossos resultados foram superiores, em relação ao trabalho de Janakiraman et al., 2014, que utilizaram o fungo *C. blakesleeana* também cultivado em glicose, e obteve 20% de ácido oléico. Segundo a literatura o ácido oléico é um importante ácido graxo utilizado, como matéria-prima na produção de biodiesel.

A elevada quantidade de ácidos graxos saturados e insaturados principalmente (C_{18:1}), (C_{18:2}) e (C_{16:0}) indicam que esse óleo possui potencial como matéria-prima para produzir um combustível de qualidade como alternativa ao diesel convencional. Também, foi observado um teor considerável do ácido esteárico (C_{18:0}), de 10,62 % pela *C. echinulata* UCP/WFCC 1299, se comparada ao cultivo da mesma em meio sintético padrão (4,51 %). Segundo estudos realizados, o ácido esteárico possui relevante importância nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos.

Foram analisados os resultados do cultivo da *C. echinulata* UCP 1299, em um meio alternativo constituído por 12% de melaço de cana-de-açúcar e 8% de milhocina, obtendo uma presença significativa dos seguintes ácidos: oleico (27,98 %), palmítico (21,17%) e linoleico (25,42 %).

Fakas et al., (2008) observaram a presença de ácido palmítico (C16: 0), (C18: 0), ácido oléico (C18: 1), linoléico (C18: 2) na biomassa produzida pelo fungo *Cunninghamella echinulata* cultivado em Ágar Dextrose de Batata (PDA), contendo glicose, concentrado de soro de leite e resíduos de tomate hidrolisado, além de milho comercial, glúten, infusão de milho e extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

Segundo Rodriguez (2011), o ácido linoleico, pode ser utilizado na indústria farmacêutica, por apresentar um elevado potencial rápido de cicatrização de feridas, por abreviar a fase inflamatória quando ingerido. Ainda o mesmo autor, indica que a ingestão de

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 58

ácido oléico modula a fase inflamatória, porém o reparo tecidual não é significativo quanto ao uso de ácido oléico. O tratamento tópico está relacionado à hidratação e elasticidade da pele que impede a entrada de micro-organismos patogênicos e a perda de água para o meio externo. Sendo assim, o ácido linoléico apresenta um elevado potencial no tratamento de feridas tóxicas.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que *C. echinulata* UCP/WFCC 1299, produziu biomassa e lipídeos a partir da bioconversão da milhocina e melão de cana-de-açúcar. Desta forma, este estudo surge como mais uma alternativa para produção destes bioprodutos de interesse industrial a partir da reutilização de resíduos agroindustriais, contribuindo assim, para minimização dos problemas ambientais.

Os resultados obtidos no experimento do Sudan Black evidenciam, qualitativamente, a acumulação de lipídeos, isto porque, o corante lipofílico ao difundir-se a partir da membrana citoplasmática para o citoplasma os corpos lipídicos (CLs), inclusões citoplasmáticas de estoque lipídico, em regiões escuras. Sendo assim, não será viável a utilização dos demais fungos testados que não apresentaram resultados satisfatórios de produção de biomassa e lipídeos, como a *C. echinulata* UCP/WFCC 1299.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, FACEPE, CAPES e a UNICAP, pelo suporte financeiro para realização desse trabalho, e ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) pela infraestrutura da execução de toda parte experimental.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, D. L., MAROTO, F. G. Plants as 'chemical factories' for the production of polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 6, p. 481-497, 2000.

ANTUNES, R., SILVA, I. C. O papel dos microorganismos no futuro dos biocombustíveis. **Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI**. 2011. Disponível em: http://www.marcaspatentes.pt/files/collections/pt_PT/1/300/302/O%20Papel%20dos%20Microorganismos%20no%20futuro%20dos%20Biocombust%20C3%ADveis.pdf; Acesso em: 07 dez. 2016.

- SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 59
- BANAT, I. M., SATPUTE, S. K., CAMEOTRA, S. S., PATIL, R., NYAYANIT, N. V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production., **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. December, p. 697, 2014.
- BURDON KL. Material Gorduroso em Bactérias e Fungos Revelados por Coloração Secas, Preparações de Fecho Fixo. **J Bacteriol.** 1946 Dec; 52 (6): 665-678.
- CARVALHO, T. F. O. Modernização agrícola e a região da Alta Mogiana Paulista: análise da expansão da produção de cana-de-açúcar em uma tradicional região cafeeira. 2014. 141f. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Instituto de Geociências e Ciências Exatas do Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho,Rio Claro, 2014.
- DOS SANTOS, S. C., FERNANDEZ, L. G., ROSSI-ALVA, J. C., ROQUE, M. R. A. Evaluation of substrates from renewable-resources in biosurfactants production by Pseudomonas strains. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 35, 2010.
- DE PARIS, L. D., SCHEUFELE, F. B., JÚNIOR, A. T., GUERREIRO, T. L., HASAN, S. D. M. *Estudo do crescimento de A. casingii em farelo de soja convencional para produção de enzimas.* **Estudos Tecnológicos Em Engenharia**, v. 6, n. 1, p. 22-35, 2010.
- DURHAM, D. R., KLOOS, W. E. Comparative Study of the Total Cellular Fatty Acids of *Staphylococcus* Species of Human Origin. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 223-228, 1978.
- FAKAS, S., ČERTIK, M., PAPANIKOLAOU, S., AGGELIS, G., KOMAITIS, M., & GALIOTOU-PANAYOTOU, M. γ -Linolenic acid production by *Cunninghamella echinulata* growing on complex organic nitrogen sources. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5986-5990, 2008.
- IMURA, T., KAWAMURA, D., MORITA, T., SATO, S., FUKUOKA, T., YAMAGATA, Y., TAKAHASHI, M., WADA, K., KITAMOTO, D. Production of Sophorolipids from Non-edible *Jatropha* Oil by *Stamerella bombicola* NBRC 10243 and Evaluation of their Interfacial Properties. **Journal of Oleo Science**, v. 62, n. 10, p. 857–864, 2013.
- JAPE, A., HARSULKAR, A., SAPRE, V. R. Modified Sudan Black B staining method for rapid screening of oleaginous marine yeasts. **International journal of current microbiology and applied sciences**, v. 3, n. 9, p. 41-46, 2014.
- MAKKAR, C., An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, n. 58, p.428–434, 2002.

- SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 60
- MANOCHA, M. S., SAN-BLAS, G., CENTENO, S. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. **Microbiology**, v. 117, n. 1, p. 147-154, 1980.
- MENG, X., YANG, J., XU, X., ZHANG, L., NIE, Q., XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable energy**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 2009.
- MURUGAN, S., ARNOLD, D., PONGIYA, U. D., NARAYANAN, P. M. Production of xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 6915 using saw dust as substrate under solid state fermentation. **Enzyme Research, London**, v. 2011, p. 1-7, 2011.
- OLIVEIRA, L. R., BATISTA, R. D. Perspectivas e situação atual da produção de biocombustíveis. **Revista Eletrônica de Energia**, v. 5, n. 1, 2015.
- BALDOTTO, M. A., BALDOTTO, L. E. B. Ácidos húmicos. **Revista Ceres**, v. 61, p. 856-881, 2014.
- PUPIN, A. M., MESSIAS, C. L., PIEDRABUENA, A. E., ROBERTS, D. W. Total lipids and fatty acids of strains of *Metarhizium anisopliae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 121-128, 2000.
- PUTZKE, J., PUTZKE, M. T. L. Os Reinos dos Fungos Vol. 2. 2002.
- RATLEDGE, C. Microbial production of gamma-linolenic acid. **Handbook of Functional Lipids**. edited by C. Akoh, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 19, 2005.
- RATLEDGE, C. Single cell oils — have they a biotechnological future? **Trends In Biotechnology**, [s.l.], v. 11, n. 7, p.278-284, jul. 1993. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-7799\(93\)90015-2](http://dx.doi.org/10.1016/0167-7799(93)90015-2).
- RODRIGUES, H.G. Modulação do processo de cicatrização pelos ácidos oléico e linoléico. **Tese de Doutorado**. Pós-graduação em Fisiologia Humana. Universidade de São Paulo (USP). 2011.
- STROPARO, E. C., BEITEL, S. M., RESENDE, J. T. V., KNOB, A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico, **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 33, n. 6, p. 2267-2278. 2012.

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 61

TAPIA, V. E., ANSCHAU, A., CORADINI, A. L.V., FRANCO, T. T., DECKMANN, A. C. Optimization of lipid production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* by random mutagenesis coupled to cerulenin screening. **Amb Express**, v. 2, n. 1, p. 64, 2012.

VICENTE, G., BAUTISTA, L. F., GUTIÉRREZ, F. J., RODRÍGUEZ, R., MARTÍNEZ, V., RODRÍGUEZ-FRÓMETA, R. A., RUIZ-VÁZQUEZ, R. M., TORRES-MARTÍNEZ, S., GARRE, V. Direct transformation of fungal biomass from submerged cultures into biodiesel. **Energy & Fuels**, v. 24, n. 5, p. 3173-3178, 2010.

ZEN C. K., SILVA K. P., REINEHR C. O., BERTOLIN T. E., COLLA L. M. Indução da síntese de lipídeos e proteínas por *Aspergillus niger*. Revista CIATEC-UPF, v. 6, n. 2, p. 40-47, 2014.

SILVA M. C. L. B. Produção de lipídeos por fungos da Ordem Mucorales isolados do solo da caatinga de Pernambuco..... 62

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES GERAIS

A partir do estudo da produção de biomassa e lipídeos por *Cunninghamella echinulata* conclui-se que o micro-organismo apresenta habilidade de crescer e produzir lipídeos em meio de resíduos agroindustriais contendo milhocina e melaço de cana de açúcar. Contribuindo para uma minimização dos custos da produção, além disso, o processo produtivo conseguiu converter os bioresíduos em insumos de alto valor para as indústrias.