
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR LINHAGENS DE *Mucor* spp.
ISOLADAS DE SOLO DE CERRADO, MUNICÍPIO DE CORUMBATAÍ, ESTADO
DE SÃO PAULO

CHRISTIAN WELLBAUM

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Microbiologia Aplicada).

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR LINHAGENS
DE *Mucor* spp. ISOLADAS DE SOLO DE ÁREA DE
CERRADO, MUNICÍPIO DE CORUMBATAÍ, ESTADO DE
SÃO PAULO**

CHRISTIAN WELLBAUM

Orientadora: Profa. Dra. Sâmia Maria Tauk-Tornisielo

Tese de Doutorado apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista,
Campus de Rio Claro, para a
obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas (Área de
Concentração: Microbiologia
Aplicada)

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil

2006

DEDICO

a minha Família.

“Alimentos são remédios,
remédios são alimentos”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas e instituições que contribuíram para a realização da presente tese, com ênfase especial para:

À Dra. Profa. Sâmia M. Tauk Tornisielo, pela orientação e dedicação.

Ao Centro de Estudos Ambientais da UNESP, pela utilização dos laboratórios e equipamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela concessão de bolsa de doutorado e pelo auxílio financeiro.

Aos docentes do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de Microbiologia Aplicada da Universidade Estadual Paulista (UNESP–Rio Claro, SP), pela sua valiosa contribuição para a minha formação acadêmica e profissional em especial ao Prof. Dr. Jonas Contieiro pela ajuda na parte experimental em escala de biorreator, e ao Prof. Dr. Antônio Carlos Simões Pião (DEMAC), pelo tratamento estatístico dos resultados.

As responsáveis pelos laboratórios do CEA a biomédica Eleni Nadai Malagutti e a química Francisca de Assis Mattioli Gonçalves pela valiosa ajuda no laboratório.

A Sara Cristina Galvão pelo auxílio burocrático.

A todos da secretaria de Pós-Graduação.

Ao químico Ari Castro ao Dr. Amauri Antonio Menegário, ao biólogo Alex Fernando de Almeida e Nilton dos Santos pela ajuda.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	6
3. REVISÃO DA LITERATURA	7
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1. Caracterização geral da área de estudo	13
4.2. Coleta de amostras de solo	15
4.3. Isolamento e quantificação dos fungos filamentosos	15
4.3.1. Técnica da placa-de-solo (WARCUP, 1950 - modificada)	15
4.3.2. Técnica da diluição em série (CLARK, 1965)	16
4.4. Identificação das culturas de fungos terrestres	16
4.5. Parâmetros determinados durante a coleta de amostras de solo	17
4.5.1. Temperatura do ar (°C).....	17
4.5.2. Temperatura do solo até 15cm de profundidade (°C).....	17
4.5.3. Teor de umidade (%) do solo	17
4.6. Inóculos	17
4.7. Otimização dos protocolos para extração de lipídeos.....	18
4.7.1. Primeira modificação proposta.....	18
4.7.2. Segunda modificação proposta.....	19
4.7.3. Terceira modificação proposta	20
4.7.4. Determinação dos ácidos graxos poliinsaturados	21
4.8. Experimento em biorreator de vidro.....	23
4.9. Preparação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos e sua análise por cromatografia gasosa.	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1. Fatores Abióticos.....	25
5.2. Número total de colônias.....	27
5.3. Táxons isolados	30
5.4. Avaliação das modificações propostas para a metodologia de extração de ácidos graxos	33
5.5. Produção de ácidos graxos pelas linhagens de <i>Mucor</i> spp.	41
5.6. Produção de lipídeos pelas linhagens de <i>Mucor</i> spp. cultivadas em biorreator.....	50
6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
7. REFERÊNCIAS	57
ANEXOS.....	66

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Isolados, identificados a nível de gênero, do solo de cerrado do município de Corumbataí na época de estiagem (inverno, 2002) e de chuvas (verão, 2003) 30
- Tabela 2.** Valores das concentrações médias (n=3-6) de ácido γ -linolênico (AGL $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e ácido araquidônico (AA $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) no meio de cultura, quantidades desses ácidos graxos ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) e a quantidade de lipídeos totais (%) em relação ao peso seco da biomassa (AGL e AA $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) de *Mucor* sp. (Linhagem M131) confrontando várias modificações da técnica de extração de lipídeos originalmente proposta por Ruegger (2001)..... 33
- Tabela 3.** Valores das concentrações médias (n = 6-8) de ácido γ -linolênico (AGL $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e ácido araquidônico (AA $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) no meio de cultura, quantidades desses ácidos graxos ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) e a quantidade de lipídeos totais (%) em relação ao peso seco da biomassa de linhagens de *Mucor* spp. ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) isoladas no cerrado de Corumbataí 42
- Tabela 4.** Valores das concentrações médias (n=6) de ácido γ -linolênico (AGL $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e ácido araquidônico (AA $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) no meio de cultura, quantidades desses ácidos graxos ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) e a quantidade de lipídeos totais (%) em relação ao peso seco da biomassa de três linhagens de *Mucor* spp. isoladas no cerrado de Corumbataí 50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relações estruturais entre os ácidos poliinsaturados $\omega 3$ e $\omega 6$ e hormônios eicosanóides.....	7
Figura 2. Localização da Reserva de Corumbataí (APA – Corumbataí).....	14
Figura 3. Parâmetros abióticos determinados durante a coleta de solo em quatro pontos com três sub-amostras cada, da área de cerrado, realizada na época de estiagem no município de Corumbataí	26
Figura 4. Número de UFC/g de solo seco, contadas após 5 dias de crescimento em placas-de-petri contendo diferentes meios de cultura (MM=malte, BDA=batata-dextrose-ágar, SMA=ágar sintético para <i>Mucor</i> , MMar=Martin, a=antibiótico) isoladas de 0-15cm de profundidade do solo da reserva de Corumbataí através da técnica da diluição em série (Clark, 1965) na época de estiagem (inverno) e na época chuvosa (verão)	28
Figura 5. Número de UFC/g de solo seco, contadas após 5 dias de crescimento em placas-de-petri contendo diferentes meios de cultura (MM=malte, BDA=batata-dextrose-ágar, SMA=ágar sintético para <i>Mucor</i> , MMar=Martin, a=antibiótico) isoladas de 0-15cm de profundidade do solo da reserva de Corumbataí através da técnica da placa-de-solo (Warcup, 1950-modificada) na época de estiagem (inverno) e na época chuvosa (verão) ...	29
Figura 6. Valores médios das concentrações (n=3-6) e desvio padrão de ácido γ -linolênico e no meio de cultura (AGL mg/L) (a), quantidade desses ácidos graxos em relação ao peso seco da biomassa (AGL mg/g) (b) de <i>Mucor</i> sp. (Linhagen M131) confrontando várias modificações da técnica de extração de lipídeos originalmente proposta por Ruegger (2001). A biomassa foi crescida em erlenmeyeres de 125mL e de 250mL com respectivamente 50mL (A,D,E,H,I) e 100mL (B,C,F,G,J,K) de solução aquosa de extrato de malte a 2%, sob agitação durante 6 dias a 25°C.....	35
Figura 7. Valores médios das concentrações (n=3-6) e desvio padrão de ácido araquidônico no meio de cultura (AA mg/L) (a) e a quantidade desse ácido graxos em relação ao peso seco da biomassa (AA mg/g) (b) de <i>Mucor</i> sp. (Linhagem M131) confrontando várias modificações da técnica de extração de lipídeos originalmente proposta por Ruegger (2001). A biomassa foi crescida em erlemeyers de 125mL e de 250mL com respectivamente 50mL (A,D,E,H,I) e 100mL (B,C,F,G,J,K) de solução aquosa de extrato de malte a 2%, sob agitação durante 6 dias a 25°C.....	36
Figura 8. Valores médios das concentrações (n=6-8) e desvio padrão da biomassa seca em relação às quantidades de meio de cultura (g/L) (a) e a quantidade de lipídeos totais (%) em relação ao peso seco da biomassa linhagens (b) de <i>Mucor</i> spp. isoladas no cerrado de Corumbataí, em cultivos realizados em erlemeyers de 125mL e de 250mL com respectivamente 50mL (A,D,E,H,I) e 100mL (B,C,F,G,J,K) de solução aquosa de extrato de malte a 2%, sob agitação durante 6 dias a 25°C	38
Figura 9. Valores médios (n = 6-8) das concentrações e desvio padrão de ácido γ -linolênico no meio de cultura (AGL mg/L) (a), e quantidades desse ácido graxo em relação ao peso seco da biomassa (AGL mg/g) (b) de linhagens de <i>Mucor</i> spp. isoladas no cerrado de Corumbataí, em cultivos realizados em erlemeyers de 125mL e de 250mL com respectivamente 50mL e 100mL de solução aquosa de extrato de malte a 2%, sob agitação durante 6 dias a 25°C.....	43

Figura 10. Valores médios (n = 6-8) das concentrações e desvio padrão de ácido araquidônico no meio de cultura (AA mg/L) (a), e quantidades desse ácido graxo em relação ao peso seco da biomassa (AA mg/g) de linhagens de *Mucor* spp. isoladas no cerrado de Corumbataí, em cultivos realizados em erlemeyers de 125mL e de 250mL com respectivamente 50mL e 100mL de solução aquosa de extrato de malte a a 2%, sob agitação durante 6 dias a 25°C..... 45

Figura 11. Valores médios (n=6-8) das concentrações e desvio padrão da biomassa seca em relação as quantidades de meio de cultura (g/L) (a) e a quantidade de lipídeos totais (%) em relação ao peso seco da biomassa linhagens (b) de *Mucor* spp. isoladas no cerrado de Corumbataí, em cultivos realizados em erlemeyers de 125mL e de 250mL com respectivamente 50mL e 100mL de solução aquosa de extrato de malte a 2%, sob agitação durante 6 dias a 25°C..... 46

Figura 12. Valores médios (n = 6-8) das concentrações e desvio padrão de ácido γ -linolênico (AGL mg/L) (a) e ácido araquidônico (AA mg/L) (c) no meio de cultura, quantidades desses ácidos graxos (mg/g) (c, d) e a quantidade de lipídeos totais (%) em relação ao peso seco da biomassa (f), e a concentração desta em relação ao meio de cultura (e) de linhagens de *Mucor* spp. (M131, M132, MX) isoladas no cerrado de Corumbataí, em cultivos realizados em erlemeyers de 125mL com 50mL de solução aquosa de extrato de malte a 2%, com ou sem suplementação de óleo de girassol a 2%, sob agitação durante 6 dias a 25-26°C..... 48

Figura 13. Valores médios (n = 6-8) das concentrações e desvio padrão de ácido γ -linolênico (AGL mg/L) (a) e ácido araquidônico (AA mg/L) (c) no meio de cultura, quantidades desses ácidos graxos (mg/g) (c, d) e a quantidade de lipídeos totais (%) em relação ao peso seco da biomassa (f), e a concentração desta em relação ao meio de cultura (e) de linhagens de *Mucor* spp. (M131, M132, MX) isoladas no cerrado de Corumbataí, em cultivos realizados em Fermentador contendo 1L de solução aquosa de extrato de malte a 2% com ou sem acréscimo de óleo de girassol a 2%, sob agitação e fluxo de ar com 2v-vm. durante 6 dias a 26°C..... 51

RESUMO

Na área de cerrado, município de Corumbataí, SP, foram isoladas 267 linhagens de fungos filamentosos em amostras de solo, coletadas no inverno (2002) e no verão (2003), pelos métodos da “Técnica da placa-de-solo” e “Técnica da diluição em série”. Destas, 12 linhagens foram consideradas potenciais produtoras de ácidos γ -linolênico (AGL) e araquidônico (AA) por pertencerem a ordem Mucorales. Foram realizados ensaios preliminares para avaliar a eficiência de diversos protocolos de extração de ácidos graxos dos fungos. Foram testadas modificações de metodologias tradicionais, adicionando uma ou duas vezes a solução extratora de metanol-clorofórmio-água (2,0:1,0:0,8 v/v) à biomassa úmida, congelada, liofilizada, seca e/ou macerada. De acordo com os resultados obtidos, optou-se por utilizar a biomassa liofilizada, tratada duas vezes com a solução extratora. Os extratos resultantes foram transesterificados e analisados por cromatografia gasosa. Algumas linhagens foram cultivadas em erlenmeyeres de 125mL e 250mL, contendo respectivamente 50mL e 100mL de meio de cultura líquido de extrato de malte a 2%, durante 6 dias sob agitação, a 25°C. Foi observado que a linhagem MX produziu maior quantidade de AGL, apresentando médias de 61,9mg·L⁻¹ e 55,7mg·L⁻¹, respectivamente, em frascos de 250mL e 125mL. Maior produção de AA foi verificada na linhagem M132, cuja média foi de 0,3mg·L⁻¹. As linhagens MX, M131 e M132 foram também cultivadas em frascos de 125mL contendo 50mL de meio líquido de extrato-de-malte suplementado com óleo de girassol a 2% e 1% de extrato de levedura. Nestes, as maiores quantidades médias de AGL, 201,62mg·L⁻¹, e de AA, 3,12mg·L⁻¹, foram observadas no cultivo da linhagem M131, sendo estes valores 1.311,15% e 1011,37% maiores em relação àqueles verificados em meio de extrato de malte. As três linhagens foram crescidas em biorreator com capacidade de 2L contendo 1L de meio de cultura de malte (2%) acrescido ou não de óleo de girassol (2%). Os resultados acompanharam as tendências daqueles obtidos nos ensaios com frascos erlenmeyeres. No meio de malte a linhagem melhor produtora de AGL foi também a MX (84,89mg·L⁻¹). Com a suplementação com óleo de girassol a linhagem melhor produtora foi também a M131 (76,35mg AGL·L⁻¹) e a linhagem MX teve uma diminuição de 96% na produção de AGL, mas um aumento de 273% na produção de lipídeos totais.

Palavras-chave: fungos; cerrado; ácido γ -linolênico; ácido araquidônico.

ABSTRACT

In the savannah area, municipal district of Corumbataí, state of São Paulo, 267 fungi strains were isolated in soil samples collected, in the winter (2002) and in the summer (2003), with the “soil plate method” and “serial dilution method”. Twelve strains were considered potential producers of γ -linolenic acid (GLA) and arachidonic acid (AA) for belonging to the order Mucorales. Preliminary experiments were accomplished to evaluate the efficiency of several protocols of extraction of fatty acids from fungi. Modifications of traditional methodologies were tested, adding one or twice the solvent solution of methanol-chloroform-water (2.0:1.0:0.8 v/v) to the wet, frozen, freeze-dried, dried and/or disrupted biomass. In agreement with the obtained results, the biomass was freeze-dried and treated twice with the solvent solution. The resulting extracts were transesterified and analyzed by gas chromatography. Some strains were cultivated in shake flasks of 125mL and 250mL, containing respectively 50mL and 100mL of liquid malt extract culture media (2%), for 6 days under agitation, at 25°C. It was observed that the strain MX produced larger amounts of GLA, mean of 61.9mg·L⁻¹ and 55.7mg·L⁻¹, respectively, in shake flasks of 250mL and 125mL. Higher production of AA was verified in the strain M132, mean of 0.3mg·L⁻¹. The strains MX, M131 and M132 were also cultivated in shake flasks of 125mL containing 50mL of liquid malt extract media enhanced with sunflower oil (2%) and yeast extract (1%). In these the largest amounts of GLA, mean of 201.62mg·L⁻¹, and of AA, mean of 3.12mg·L⁻¹, were observed in the cultivation of the strain M131, these values being 1,311.15% and 1,011.37% larger in relation to those verified in same strain cultivated in malt extract media. The three strains were grown in Bioreactor with capacity of 2L containing 1L of malt extract media (2%) added or not with sunflower oil (2%). The results accompanied the tendencies of those obtained in the experiments with shake flasks. The better strain that produce the higher levels of GLA with only malt extract media as substrate was also MX (84.89mg·L⁻¹). With the enhance of sunflower oil the best producing strain was also M131 (76.35mg·L⁻¹), and the strain MX had a decrease of 96% in the production of GLA but an increase of 273% in the production of total lipid content.

Keywords: fungi; savannah; γ -linolenic acid; arachidonic acid.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos antiqüíssimos, seus registros fósseis datam do Devoniano e da era Pré-Cambriana. As primeiras observações desses microrganismos de que se têm registro foram realizadas por gregos e romanos. Existem, entretanto, objetos de arte descobertos, que parecem representar fungos ou algo relacionado com os mesmos, pertencentes a civilizações anteriores a essas (AINSWORTH, 1965). Especula-se que nossos antepassados primitivos tiveram contato e utilizaram fungos como alimento ou para outros fins (MOORE-LANDECKER, 1996).

Como organismos cosmopolitas e diversificados, os fungos exercem papel de relevância nos diferentes ecossistemas que integram. Christensen (1989) enumerou vinte funções principais desses microrganismos, porém, estando ainda longe de abranger toda a gama de atuação dos mesmos, dentre elas: decomposição da matéria orgânica; acúmulo de substâncias tóxicas; modificação da permeabilidade do solo e de suas trocas iônicas; destoxificação de solos; síntese de substâncias húmicas; simbioses; parasitismo; predação; produção de imunossuppressores e de antibióticos; produção de biomassa, utilizada para compor alimentos e rações; maturação de alimentos; alteração ou supressão de nichos ecológicos e intemperização primária.

Tanto no ambiente terrestre como no aquático, os microrganismos desempenham papel central na decomposição do material vegetal durante o processo de mineralização. Em torno de 80 a 90% da produção primária anual, e 90 a 100% da produção primária líquida são absorvidas pelos decompositores, dentre eles: fungos, actinomicetos e bactérias. Dependendo do substrato a ser decomposto, os fungos podem ser os pioneiros do processo, devido ao potencial enzimático que apresentam (CHRISTENSEN, 1989). Em alguns ecossistemas foi possível avaliar que 89% da biomassa dos decompositores foram representadas por fungos (FRANKLAND, 1982). Esses microrganismos são mediadores do fluxo de energia e dos ciclos de nutrientes para outros níveis tróficos, pois decompõem a matéria orgânica em sub-compostos, podendo mineralizá-la e assim devolvendo nutrientes ao ecossistema (ODUM, 1983). Eles também podem aumentar a palatabilidade e a qualidade nutricional dos restos vegetais para os animais detritívoros (BÄRLOCHER, 1985; GESSNER; CHAUVET, 1993).

Conhecendo-se as funções dos fungos nos ecossistemas é possível avaliar, previamente, qualquer tipo de intervenção nos mesmos, principalmente a antrópica. Assim, alterações podem ser evitadas ou minimizadas e medidas da preservação ou recuperação desses ecossistemas podem ser facilitadas (MILANEZ, 1995).

A micologia como ciência nasceu com a invenção do microscópio em meados de 1600, mas eram poucos os entusiastas que pesquisavam os fungos. Antes disso, estes foram estudados por “herbalistas”. O conjunto de organismos que o micólogo estuda, só despertou maior interesse, na comunidade científica a partir do século XVIII, mas ainda de maneira modesta e se restringiu aos médicos (MOORE-LANDECKER, 1996).

Durante muito tempo os fungos foram considerados vegetais e somente a partir de 1969, com a classificação dos seres vivos proposta por Whittaker em cinco reinos, eles passaram a ser classificados como um reino à parte. No intuito de reconhecer grupos monofiléticos (grupos que contêm um ancestral e todos seus descendentes), os organismos outrora classificados como fungos são atualmente considerados como fazendo parte de três grupos diferentes: dois reinos monofiléticos Fungi e Stramenopila e em quatro filos dos protistas. Dessa forma se reconhece o fato de que os fungos não são todos aparentados. Apesar de todos esses organismos não participarem da mesma história evolucionária, eles formam um grupo estreitamente unido, baseado na sua morfologia, exigências nutricionais e ecologia (ALEXOPOULOS et al., 1996). Os fungos, além de serem geneticamente bem separados das plantas, estão mais próximos dos animais (HAWKSWORTH, 1997).

Progressos recentes na ciência demonstram que as potencialidades dos fungos estão apenas começando a serem desvendadas. O conhecimento das atividades dos microrganismos nos ecossistemas permitiria a sua “domesticação” para que eles pudessem executar funções de interesse para a sociedade. Conhecendo-se as habilidades dos fungos e como potencializá-las, há possibilidades de utilizá-los na produção de substâncias como ácidos orgânicos, antibióticos, substâncias aromáticas, enzimas, açúcares, fármacos, entre outros. Há uma década atrás calculou-se que um pouco mais de 0,1% do potencial de fungos descritos têm sido utilizado pelo homem (MILANEZ, 1995; HAWKSWORTH, 2001).

À medida que cada vez mais se compreende o papel dos fungos nos ecossistemas, maior será o seu aproveitamento em relação ao homem, principalmente com o aprimoramento das técnicas biotecnológicas que vêm otimizando e ampliando o uso dos fungos sob ponto de vista econômico. Mesmo sendo esses microrganismos amplamente utilizados por inúmeros povos antepassados como alimento, remédio, e em cerimônias religiosas, apenas recentemente está se redescobrendo e descobrindo suas potencialidades quase que ilimitadas. Hoje em dia os fungos são de interesse para taxonomistas, morfologistas, geneticistas, ecologistas, fitopatologistas, botânicos, médicos, patologistas, bioquímicos, microbiologistas industriais, entre outros. Eles estão se tornando ferramentas cada vez mais importantes na pesquisa básica e aplicada (MOORE-LANDECKER, 1996) e também na indústria.

Mas para que se possa utilizá-los na ciência aplicada, quer seja como agentes de biocontrole ou biorremocão de poluentes ou ainda na produção de fármacos e afins, deve-se antes conhecê-los, deve-se notificar e documentar todos os pormenores de seus ciclos de vida e como eles se comportam no ambiente natural. Pois, somente conhecendo seu modo de vida e suas interações com os fatores bióticos e abióticos do ecossistema, pode-se otimizar a utilização desses organismos para os mais diversos fins.

Especulou-se em cima de números sobre a diversidade de fungos chegando-se a estimativa considerada conservadora de 1,5 milhões de táxons de fungos, aproximadamente seis vezes a estimativa do número de plantas vasculares. O número de espécies de fungos conhecidas é de pelo menos 74.000, mas pode-se aceitar a marca de 120.000 se forem levadas em consideração as espécies que não foram ainda descritas corretamente em seus respectivos grupos taxonômicos. Destas, apenas cerca de 2.000 tinham sido utilizadas de alguma forma pelo homem. Estes dados fornecem informações de que talvez menos de 5% dos fungos existentes na natureza são realmente conhecidos (HAWKSWORTH, 1991, 2001).

A crescente urbanização e o desenvolvimento de atividades agrícolas tem acelerado o processo natural de eutrofização, comprometendo a qualidade da água e do solo, abreviando a vida útil dos ecossistemas. Os efeitos gerais das perturbações humanas nos ecossistemas podem levar a uma diminuição progressiva da diversidade de espécies, conforme aumenta a intensidade e/ou a frequência do impacto, interferindo também nas interações tróficas do sistema. Mudanças ambientais artificiais menos drásticas podem resultar no desaparecimento de espécies pouco tolerantes a essas alterações, acarretando aumento da abundância de grupos de organismos resistentes (PRAT; WARD, 1994). A cada dia, portanto, pode estar havendo perdas valiosas de linhagens produtoras de macromoléculas importantes e de interesse biotecnológico.

O Brasil é um país com enorme biodiversidade, abrigando mais de 10% de todos os organismos descritos na terra. Mesmo que a maioria das discussões sobre diversidade focalize a região Amazônica, é fundamental não se esquecer que os ecossistemas denominados Cerrados e Mata Atlântica são, da mesma forma, muito ricos em espécies endêmicas, além de se constituírem em biomas genuinamente brasileiros. Mais de 11 milhões de hectares de florestas tropicais foram convertidas em plantações, pastagens e possuem ocupação humana desordenada, portanto, a conservação da diversidade biológica, especialmente, em áreas ainda não degradadas, é prioridade mundial. (PINTO et al., 2002).

Além disso, o cerrado ocupa aproximadamente um quarto da área brasileira (PRIMAVESI, 1990) e abrange as regiões norte, nordeste, central e sul do país. Lopes (1984)

citou que este tipo de ecossistema se estende por 20% do território brasileiro ocupando 1,8 milhão km². Geralmente o cerrado situa-se em regiões de topografia favorável à agricultura e à pecuária (PRIMAVESI, 1990), assim tem sido um componente dos mais importantes na expansão da fronteira agrícola nacional. A demanda por terras agricultáveis e o estímulo de políticas públicas nas décadas de 60 e 70, como o reflorestamento incentivado, talvez explique a drástica redução da ordem de 87% das áreas de cerrado no Estado de São Paulo, no período de 1962 a 1992. As culturas que mais contribuíram para a redução dessas áreas foram cana-de-açúcar, pastagem, culturas temporais e a citricultura (KRONKA, 1998; TEIXEIRA et al., 2004).

A biodiversidade do cerrado além de pouco protegida, ainda é pouco conhecida, muito pouco manejada de maneira sustentável e continua sendo ameaçada (BRITO, 1997; FELFILI et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2004). Medidas para conservação da biodiversidade têm sido tomadas em função do mapeamento vegetal, não se levando em conta as comunidades microbianas (NANTEL; NEUMANN, 1992). Diante da importância dos microrganismos para a manutenção do equilíbrio nutricional e energético dos ecossistemas, há necessidade de se acumular informações sobre os padrões de distribuição, diversidade e quantidade de indivíduos nos ecossistemas preservados, para subsidiar a adoção de medidas conservacionistas ou para criar alternativas de recuperação de sistemas impactados.

Torna-se necessário descobrir e catalogar o maior número de microrganismos possível, antes que os ecossistemas naturais onde eles se encontram sejam destruídos, com conseqüente extinção destes. Em decorrência, haverá perdas de distintas aplicabilidades desses organismos em diferentes atividades antrópicas. Os potenciais fungos de interesse podem residir justamente em áreas inexploradas, ou naquelas onde ocorrem impactos antrópicos, ou ainda, onde há ameaça de extinção das mesmas, como no caso dos cerrados no Estado de São Paulo.

Na tentativa de contribuir com os enfoques acima citados, vêm sendo desenvolvidos na UNESP, Campus de Rio Claro, desde 1980, diferentes estudos com distintas abordagens sobre a microbiota do solo em áreas de cerrado, na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, nas caatingas, em solos poluídos com efluentes industriais, em culturas de cana-de-açúcar, milho, buriti e eucalipto. Especificamente no solo de área de cerrado, na profundidade até 15cm, foram realizadas determinações dos tamanhos populacionais de bactérias, actinomicetos e fungos filamentosos, em parcelas do solo natural e em outras tratadas com doses cumulativas de vinhaça, durante doze anos (COSTA, 1983; PALMA, 1988; TAU-K-TORNISIELO, 1987, 1990; TAU-K-TORNISIELO; RUEGGER, 1987; TAU-K-TORNISIELO; MALAGUTTI, 1997). Nessas parcelas também foram estudadas as velocidades de decomposição do folheto

de *Ocotea pulchella* na superfície e dentro do solo, juntamente com a sucessão fúngica que ocorre durante este processo (SCHOENLEIN-CRUSIUS, 1988; SCHOENLEIN-CRUSIUS; TAUKE, 1991). Até a profundidade de 100cm foram realizados estudos sobre teores de ácidos húmicos e fúlvicos, relacionando-os com a microbiota presente nos diferentes horizontes (RAYMUNDO JR, 1992).

Os resultados obtidos nesse tipo de solo de área de cerrado, juntamente com aqueles realizados na região do Banhado Grande da Estação Ecológica de Juréia-Itatins sobre biodiversidade de fungos e aplicação biotecnológica destes quanto à produção de enzimas e ácidos graxos (RUEGGER, 2001; TAUKE-TORNISIELO et al., 2005) contribuíram para dar continuidade aos estudos, buscando-se melhor conhecimento dos fungos filamentosos do solo da área de cerrado, e a possível aplicabilidade destes, quanto a produção de ácidos graxos.

É precário o conhecimento sobre os fungos das regiões de cerrado do Estado de São Paulo, e, quando existem eles são pontuais. As áreas sobre as quais existem dados ou trabalhos publicados resume-se a: Corumbataí, Moji-Guaçu, Moji-Mirim, Itirapina, São Carlos, Luíz Antônio e Assis (MILANEZ et al., 1997; TAUKE-TORNISIELO et al. 2005).

Os fungos como produtores de várias substâncias de interesse para o homem oferecem vantagens diversas em relação às outras fontes; têm o ciclo de vida curto, na sua maior parte é haplóide, evitando problemas de dominância gênica; possibilitam cultivo geralmente acessível quanto ao espaço e meios de cultura; proporcionam fácil obtenção de mutantes; apresentam morfogênese de estruturas reprodutivas controláveis; e, são de fácil manipulação industrial (MILANEZ, 1995).

Os fungos oferecem uma fonte economicamente viável de ácidos graxos de cadeia longa (SANCHOLLE; LÖSEL, 1995), pois têm grandes rendimentos e um potencial enorme de custo/eficiência da produção desses compostos (WEETE; GANDHI, 1992).

2. OBJETIVOS

O presente estudo pretende contribuir para a documentação científica adequada dos isolados, visando algumas das suas potencialidades de interesse industrial.

Os principais objetivos foram:

- isolar fungos do solo de uma área de cerrado localizada no município de Corumbataí, Estado de São Paulo;
- verificar o potencial de algumas linhagens selecionadas de Mucorales na produção de ácidos graxos insaturados,
- avaliar a produção de biomassa, ácido γ -linolênico e ácido araquidônico em condições definidas, e o efeito da adição de óleo de girassol em frascos e em escala de biorreator.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Ácidos graxos poliinsaturados são componentes essenciais de eucariotos superiores e estão recebendo maior atenção em razão do seu valor fisiológico, industrial e farmacêutico (RADWAN 1991; DYAL; NARINE, 2005; WARD; SINGH, 2005). Estes ácidos graxos com suas funções estruturais e funcionais únicas se distinguem por duas funções principais. A primeira diz respeito a sua atuação na regulação da arquitetura, dinâmica e fase de transmissão e permeabilidade das membranas, modulando o comportamento de proteínas constituintes das membranas bem como receptores, ATPases, proteínas transportadoras e canais de íons (HORROBIN, 1995). Eles ainda controlam a expressão de certos genes (SESSLER; NTAMBI, 1998), portanto, afetando alguns processos incluindo a biossíntese de ácidos graxos e o transporte de colesterol dentro do corpo (HORROBIN, 1995). Mas o maior interesse é focalizado no papel secundário dos ácidos graxos poliinsaturados como precursores de uma ampla variedade de metabólitos (prostaglandinas, leucotrienos e hidroxí-ácidos graxos, Figura 1) regulando funções biológicas cruciais (HORROBIN, 1995).

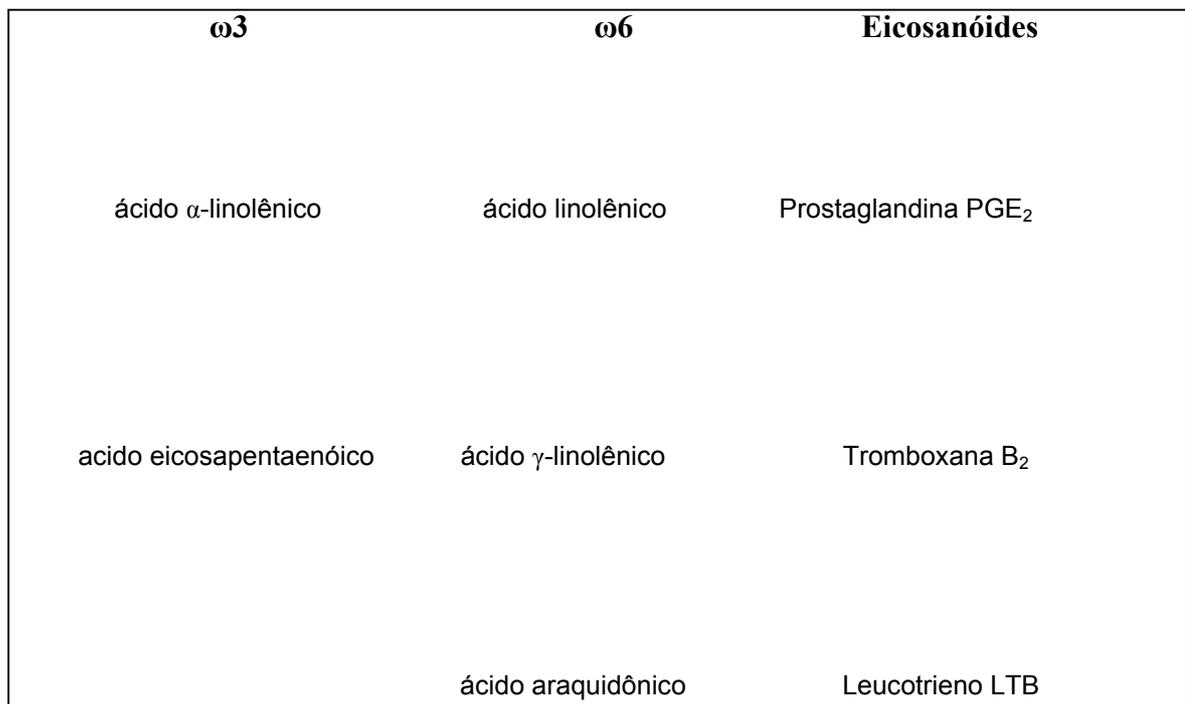


Figura 1. Relações estruturais entre os ácidos poliinsaturados $\omega 3$ e $\omega 6$ e hormônios eicosanóides.

Conseqüentemente sua deficiência no corpo leva as anormalidades na pele, no sistema nervoso, nos sistemas imune e inflamatório, no sistema cardiovascular, no sistema endócrino, rins e nos sistemas respiratório e reprodutivo. Pelo fato dos mamíferos não possuírem a habilidade de sintetizar tais compostos, estes devem ser supridos através da dieta

(HORROBIN, 1995). Várias moléculas de lipídeos sintetizadas por fungos receberam grande atenção na biotecnologia como fatores especiais na dieta ou como agentes farmacológicos (SANCHOLLE; LÖSEL, 1995). Determinados grupos de fungos podem produzir ácidos graxos, destacando-se os insaturados como γ -linolênico (AGL) e araquidônico (AA). O primeiro é de interesse farmacológico, pois é precursor das prostaglandinas da série PGE₁. Comercialmente o ácido γ -linolênico ou ácido cis, cis, cis-6, 9, 12-octadecatrienóico (C_{18:3}) é encontrado nos óleos de sementes de plantas das famílias Oenotheraceae ou Boraginaceae (WEETE; GANDHI, 1992). Esse ácido graxo é o principal componente em preparações farmacêuticas que apresentam efeitos benéficos nos tratamentos de eczema atópico, doenças cardiovasculares, diabetes, síndrome pré-menstrual, câncer dentre outras condições (WAINWRIGHT, 1992).

É conhecido há muitos anos que os membros pertencentes à ordem Mucorales produzem AGL, mas somente com o avanço das técnicas de análise química se tornou evidente que a maioria dos Zigomicetos e fungos filogeneticamente inferiores produzem misturas de α e γ isômeros de C_{18:3} (WEETE; GANDHI, 1992).

A ocorrência de níveis significativos de AGL em plantas é rara e as fontes comerciais mais importantes são sementes de:

- Prímula (*Oenothera biennis* L.) 8-10%
- Borragem (*Borago officinalis* L.) 24-25%
- Groselha-negra (*Ribes nigrum* L.) 16-17% (LAWSON; HUGHES, 1988).

O AGL é o precursor metabólico do AA, mas sua conversão é muito lenta, que é mediada pela enzima Δ -desaturase que está presente em concentrações baixas em seres humanos (WARD; SINGH, 2005).

O AA (C_{20:4}, ácido cis-5, 8, 11, 14-eicosatetraenóico) é o ácido graxo poliinsaturado mais abundante em humanos, presente em todos os órgãos, músculos e sangue (HIGASHIYAMA et al., 2002; WARD; SINGH, 2005). Também é de interesse farmacológico, pois é precursor das prostaglandinas da série PGE₂ (WEETE; GANDHI, 1992) e de tromboxanos (SANCHOLLE; LÖSEL, 1995). Ele também é produzido por alguns Zigomicetos e pela maioria dos fungos inferiores (WEETE; GANDHI, 1992). Evidências clínicas claras estão começando a se acumular demonstrando que o AA tem particular importância, pois forma a maior parte dos ácidos graxos encontrados no tecido cerebral (RATLEDGE, 2004; WARD; SINGH, 2005). Ele está diretamente envolvido com a produção de anandamida, um ligante natural endógeno para os receptores opióides e canabinóides, que se expressa em certas áreas do sistema nervoso central e contribui para a memória, cognição

movimento, percepção a dor, sensação de bem estar e de prazer (SUGIURA et al., 1996; SUGIURA et al., 2002; HIGASHIYAMA et al., 2002). O ácido araquidônico está envolvido com o desenvolvimento neural e da retina. Ele é encontrado em altas proporções no leite materno humano, mas ausente no leite de vaca ou nas fórmulas de suplementos alimentares infantis que são usados como substitutos do leite materno. O AA é um importante nutriente na dieta de neonatos e suas mães, mas o problema está justamente em se obter quantidades suficientes desse ácido graxo para oferecê-lo como suplemento nutricional. Portanto, sua produção através de microrganismos pode abrir enormes possibilidades econômicas (HIGASHIYAMA et al. 2002; RATLEDGE, 2004).

Ácidos graxos poliinsaturados maiores, com mais de 18 carbonos, como o AA, não podem ser sintetizados por plantas (CERTIK; SHIMIZU, 1999; RATLEDGE, 2004, WARD; SINGH, 2005). Por isso, são extraídos comercialmente de peixes, tendo o inconveniente de possuírem gostos e odores muitas vezes desagradáveis e uma utilização satisfatória requer ainda a remoção de colesterol e impurezas tóxicas (CERTIK; SHIMIZU, 1999). Existem ainda sérias dúvidas sobre o uso do óleo de peixe como suplemento alimentar, devido à presença de poluentes antropogênicos como dioxinas, PCB's, metais pesados, incluindo chumbo, que se concentram no fígado bem como em outros órgãos dos peixes (RATLEDGE, 2004; WARD; SINGH, 2005). Mesmo se tratando o produto adequadamente, a produção de óleo de peixe não é suficiente para a demanda de um possível produto a ser utilizado em profilaxias (CERTIK; SHIMIZU, 1999).

O AGL e AA foram os primeiros ácidos graxos a serem considerados essenciais por não serem sintetizados dentro do corpo humano, sendo portanto incorporados pela dieta (HORROBIN, 1992; SANCHOLLE; LÖSEL, 1995; CARVALHO et al., 2003). Esses dois ácidos graxos ainda são responsáveis pela modulação da estrutura da membrana das células, pelo controle de impermeabilidade da água na pele, pela permeabilidade de outras membranas como a do trato gastrointestinal e pela barreira hematoencefálica, regulação da síntese e do transporte de colesterol. A fluidez e a flexibilidade de todas as membranas do nosso corpo é influenciada pelo conteúdo desses ácidos graxos e seus derivados (HORROBIN, 1992; WARD; SINGH, 2005).

Microrganismos freqüentemente são considerados para produção de óleos e gorduras como uma alternativa das fontes agrícolas e animais. A diversidade microbiana pode facilitar a seleção de cepas produtoras de óleo com perfis (mistura dos diversos óleos) predominantemente diferentes, podendo assim constituir em uma alternativa aos produtos de óleo vegetal e animal. O AGL foi o primeiro ácido graxo poliinsaturado de microrganismos a

ser estudado. As espécies mais adequadas à utilização comercial parecem ser as da ordem Mucorales. Alguns destes fungos produzem um conteúdo satisfatório de ácido γ -linolênico na biomassa (4%) e asseguram um rendimento relativamente alto de óleo (em torno de 20% da biomassa) (CERTIK; SHIMIZU, 1999).

A produção de óleos microbianos é agora uma realidade econômica (RATLEDGE, 2004; WARD; SINGH, 2005). O acúmulo de óleos por microrganismos ocorre, principalmente, por fungos em conjunto com um restrito grupo de algas. Embora entidades os sugerissem há muito tempo como alternativas viáveis a óleos e gorduras vegetais, a primeira produção em escala comercial no Reino Unido não havia começado até 1985 e durou somente seis anos. O óleo foi produzido usando-se *Mucor circinelloides* (*M. javanicus*), que foi escolhido por ser rico em AGL, podendo ser uma alternativa do oneroso óleo de primula (*Oenothera biennis* L.) (RATLEDGE, 2004). No processo microbiológico utilizando tanque fermentador de 200 mil litros, o fungo acumulou 20% de lipídeos na biomassa e seu óleo apresentou 15-18% de AGL. Apesar do óleo, após a extração e refino, ser de alta qualidade e seu conteúdo de AGL ser o dobro do que no óleo extraído de primula, as dificuldades de “marketing” foram a principal razão para a suspensão de sua produção industrial (CERTIK; SHIMIZU, 1999). Apesar da produção não ter durado muito, nunca foi estabelecido que microrganismos pudessem ser alternativas comerciais realistas a óleos de plantas, e que o óleo em si poderia ser extraído e purificado usando a tecnologia convencional, sem a necessidade de unidades onerosas especificamente construídas para tratar o óleo microbiano (RATLEDGE, 2004; DYAL; NARINE, 2005).

Outro processo biotecnológico para a obtenção de AGL continua a funcionar até os dias de hoje no Japão usando linhagens de *Mortierella* spp. e de *Mucor* spp. Na Eslováquia se utiliza *Mucor mucedo* e *Cunninghamella echinulata* (30mg g⁻¹ de micélio). Na África do Sul a relação entre produtos de refugo da indústria petroquímica e a produção de AGL por fungos crescidos sobre esse tipo de substrato é estudada (CERTIK; SHIMIZU, 1999).

No final da década de 80 um trabalho no Japão mostrou que o AA era o principal componente do óleo de *Mortierella alpina* (TOTANI et al., 1992). Para a produção de AA são usados alguns processos na Europa, China e Japão (RATLEDGE, 2004).

Apesar da contribuição dos microrganismos para a indústria de óleo ser praticamente negligenciada, existem várias razões a seu favor:

- Os óleos microbianos têm a vantagem de possuir somente ácidos graxos poliinsaturados, diferentemente dos óleos de plantas e de animais que possuem além dos insaturados, os ácidos graxos saturados.

- Ácidos graxos poliinsaturados microbianos são os tipos de óleos com maiores valores comerciais, preferíveis ao óleo de soja, girassol dentre outros de menor qualidade.
- Suas taxas de crescimento extremamente altas e em uma variedade enorme de substratos permitem a utilização de matérias primas baratas ou mesmo a custo zero na formulação de meios de cultura.
- A produção de óleo pode ser feita ao longo do ano inteiro, pois não há dependência sazonal ou climática.
- As fontes microbianas podem suprir ácidos graxos poliinsaturados de grau farmacêutico mais concentrados do que as outras fontes e com qualidade controlada.
- O potencial da maquinaria enzimática de microrganismos permite ainda a produção simultânea de óleos e outros produtos de interesse industrial.
- A manipulação de genes para a otimização da produção, bem como os mutantes são de controle e monitoramento bem mais fácil do que os organismos mais complexos, como plantas e animais dispostos no ambiente.
- Microrganismos são riquíssimos em proteínas, elementos traço, vitaminas, antioxidantes e outros compostos, portanto, podem ainda ser usados como macro e micronutrientes, tanto no processo de produção, como na formulação de algum produto final com fins farmacêuticos e/ou alimentícios (CERTIK; SHIMIZU, 1999; RATLEDGE, 2004).

Na produção industrial ainda tem vantagem sobre outras fontes de óleos, pois não necessita de grandes extensões de terra agriculturáveis e de enormes quantidades de água. Suas instalações poderiam estar dispostas em qualquer tipo de terreno e podem ser modestas mesmo para produzir grandes quantidades de óleo, sem prejudicar o habitat natural com o mesmo impacto ambiental ocasionado por outras fontes.

Para esse tipo de produção reemergir economicamente deve-se identificar um óleo ou óleos que não são fáceis de serem produzidos agriculturalmente e que intrinsecamente, tenham alto valor comercial. O óleo microbiano deve ter alto valor comercial para que possa cobrir os custos de sua produção (RATLEDGE, 2004; DYAL; NARINE, 2005).

A bioprospecção (screening) dos microrganismos potenciais produtores de ácidos graxos poliinsaturados é o primeiro passo, sendo essencial na produção de óleo ao nível comercial, limitando assim o número de cepas para estudos posteriores e aplicações práticas (CERTIK; SHIMIZU, 1999).

De acordo com Certik e Shimizu (1999), as espécies mais adequadas a utilização comercial parecem ser as da ordem Mucorales. Alguns destes fungos possuem um conteúdo satisfatório de ácido γ -linolênico na biomassa (4%) e asseguram um rendimento relativamente alto de óleo total (em torno de 20% da biomassa). Outros pesquisadores relataram que membros dos zigomicetos produzem de 10-30% de ácido γ -linolênico na fração lipídica total (EMELYANOVA 1997; WEETE et al. 1998, DYAL; NARINE, 2005).

Família Mucoraceae

Esta família é representada por 20 gêneros e cerca de 130 espécies, sendo que somente o gênero *Mucor* compreende 80 espécies. É a mais numerosa das famílias da ordem Mucorales que é a ordem com maior número de espécies (em torno de 300) da classe dos Zygomycetes do filo Zygomycota, considerado como grupo de fungos verdadeiros do reino Fungi. O grupo dos zigomicetos caracterizam-se por apresentarem micélio constituído por quitina e quitosano, geralmente com vários núcleos que não são separados por parede celular (micélio cenocítico). O septo só é produzido quando as colônias envelhecem e apenas na delimitação dos órgãos de reprodução e dispersão. A sua capacidade de degradação se limita a moléculas de estrutura mais simples como a glicose e a sacarose ou outros açúcares, sendo por essa peculiaridade colonizadores primários de substratos em decomposição, e chamados de “fungos do açúcar”. Os membros dessa família são sapróbios em solo e detritos vegetais, caracterizando-se pela formação de estruturas de dispersão por reprodução sexuada ou assexuada (mais comum, Mucorales apresenta alto grau de heterotalismo com elaborado sistema hormonal) os esporângios que contêm centenas a milhares de esporos globosos ou ovóides. Os esporângios são geralmente globosos, inflados e apresentam uma columela central. Quando a reprodução é sexuada ocorre uma fusão de dois micélios compatíveis geneticamente, formando uma estrutura chamada zigosporângio, no interior do qual se encontra o zigoto formado pela fusão dos núcleos das hifas dos dois micélios. Esta estrutura pode ser melanizada e apresentar ornamentações. O nome do grupo vem justamente dessa reprodução característica, significando fungo (mykes) que tem zigoto (zygós=ovo) (ALEXOPOULOS et al., 1996; PUTZKE; PUTZKE, 1998; TRUFEM, 1999).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização geral da área de estudo

É uma área protegida de vegetação de cerrado localizada no município de Corumbataí (Figura 2), anteriormente pertencente à FAPESP e atualmente, se encontra sob a responsabilidade do Instituto de Biociências (IB) UNESP, Campus de Rio Claro. Essa área localiza-se nas coordenadas entre os meridianos 47°40'O e 47°45'O e 22°10'S e 22°15'S descritas na Folha Corumbataí, escala 1:50.000, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1971). Esta área abrange 38,7ha com altitude máxima de 850m e mínima de 790m, estando protegida de cortes e queimadas desde 1962. O relevo da região encontra-se numa faixa de transição entre planalto e colina (CAMARGO; ARENS, 1967).

A vegetação dessa área inclui desde campo limpo até cerradão, floresta xeromorfa com um pequeno trecho de mata seca (CAMARGO; ARENS, 1967). Estudos florísticos demonstraram a presença de árvores com 4 até 12m de altura com representantes, principalmente das famílias Myrtaceae, Leguminosae, Thymelaceae, Lauraceae, Vochysiaceae e Melastomataceae (CAMARGO; ARENS, 1967; CESAR et al., 1988, PAGANO et al., 1989).

Segundo Almeida et al. (1981) o solo dessa região foi classificado como latossolo vermelho amarelo, fase arenosa, porém citado em Tauk (1987) como latossolo vermelho amarelo, textura média, todavia a tendência atual novamente é de utilizar fase arenosa. O clima da região possui características de tropical úmido com duas estações bem definidas, uma chuvosa de outubro a março e outra seca de abril a setembro (MONTEIRO; AULINO, 1981). O cerrado desta região possui características próprias: serapilheira espessa, baixo teor de umidade no solo, este por sua vez ainda se apresenta com acidez elevada, níveis elevados de matéria orgânica e alumínio, pobre em cálcio, magnésio, potássio e fósforo (COSTA, 1983)

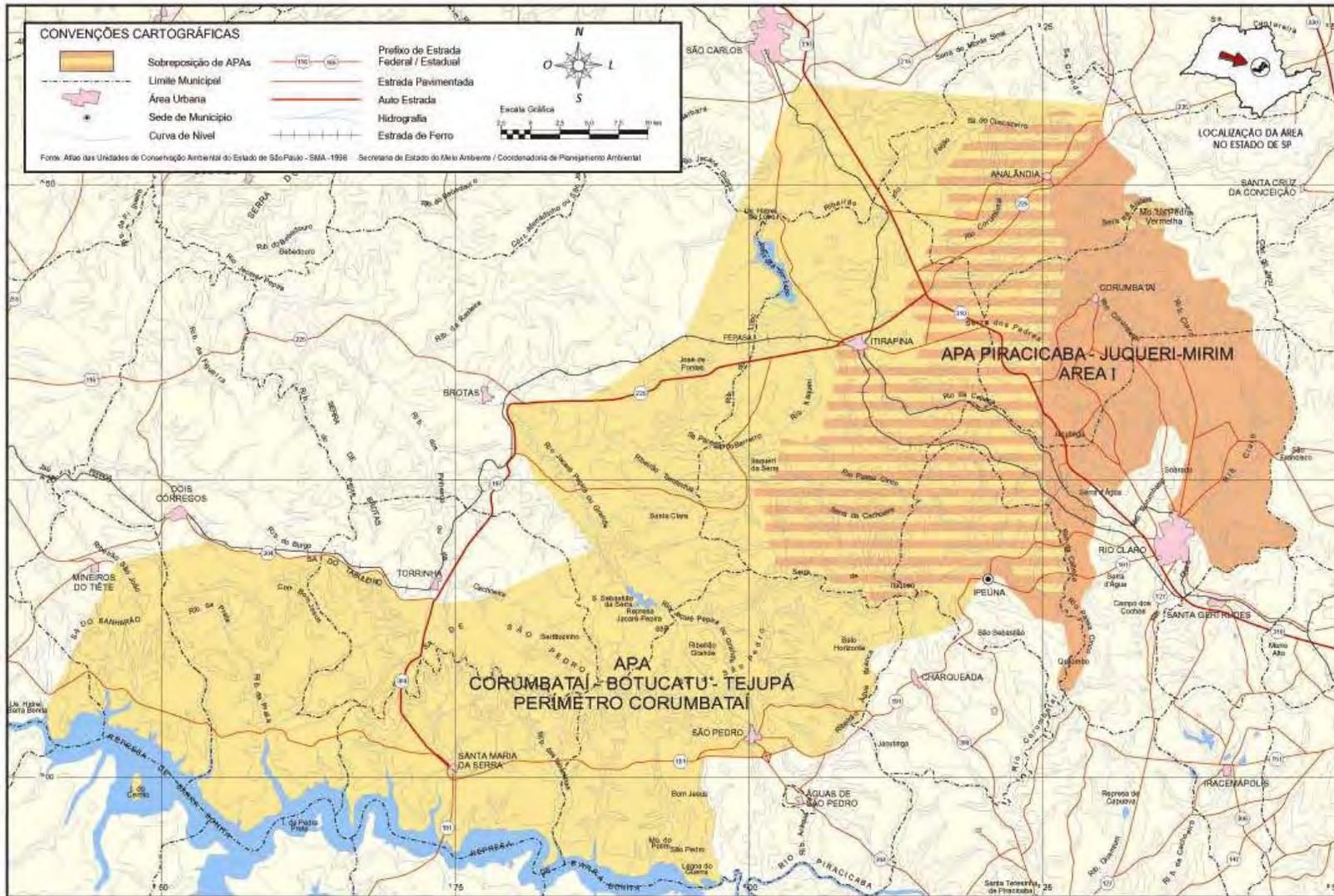


Figura 2. Localização da Reserva de Corumbataí (APA – Corumbataí)

4.2. Coleta de amostras de solo

Foram realizadas duas coletas de amostras de solo, uma no verão (período de chuvas) e outra no inverno (período de estiagem), tentando abranger as partes mais conservadas dentro da área do cerrado. A primeira coleta foi efetuada no dia 6 de julho de 2002 e a segunda coleta no dia 28 de março de 2003. Em cada coleta foram retiradas 4 amostras compostas de solo (cada uma delas constituída de três sub-amostras), de 0-15cm de profundidade, retirando-se a serapilheira. Cada amostra foi constituída de aproximadamente 300g de solo, sendo este retirado com um trado. As amostras foram acondicionadas em sacos de polipropileno, devidamente esterilizados e etiquetados, e levadas para o laboratório, para posterior isolamento das linhagens de fungos.

4.3. Isolamento e quantificação dos fungos filamentosos

As amostras de solo foram submetidas a duas técnicas distintas, para a obtenção das colônias de fungos filamentosos, descritas a seguir.

4.3.1. Técnica da placa-de-solo (WARCUP, 1950 - modificada)

Preparou-se uma suspensão de 1g de solo em 100mL de água destilada esterilizada. Dessa solução, 1mL (diluição 10^{-2}) foi assepticamente transferido e distribuído homogeneamente (com alça de Drigalski) sobre o meio de cultura acrescido de estreptomicina ou não (adaptado de MARTIN, 1950), contido em placas-de-petri. Este procedimento foi conduzido em triplicata para cada amostra de solo em diferentes meios de cultura como meio de Martin (MMar) (MARTIN, 1950), meio de extrato-de-malte (MM), meio de batata-dextrose-ágar (BDA) (DIFCO MANUAL, 1972) e meio “Synthetic Mucor Agar” (SMA, ágar sintético para *Mucor*) (HESELTINE; ANDERSON, 1957) na tentativa de se obter maior número de linhagens isoladas.

4.3.2. Técnica da diluição em série (CLARK, 1965)

Preparou-se uma suspensão de 1g de solo em 9mL de solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada para cada amostra composta de cada ponto de coleta, obtendo-se uma diluição com concentração 10^{-1} do inóculo. Foi utilizada diluição seriada até 10^{-4} , e em seguida, 1mL de cada diluição (10^{-1} a 10^{-4}) foi assepticamente transferido e distribuído homogeneamente (com alça de Drigalski) sobre os meios de cultura (acrescido ou não de estreptomicina) contidos em placas-de-petri.

Este procedimento foi conduzido em triplicata para cada diluição, de cada amostra coletada, nos dois períodos seco/frio e úmido/quente. Além do meio de Martin, foram utilizados outros meios de cultura com diferentes composições (MM, BDA, SMA) na tentativa de se obter maior número de linhagens isoladas. As placas-de-petri foram incubadas à temperatura ambiente (em torno de 28 °C), durante cinco dias para a quantificação do número total de colônias.

4.4. Identificação das culturas de fungos terrestres

As linhagens foram isoladas transferindo-se frações das mesmas para um novo meio de cultura. As características morfológicas das estruturas de reprodução (esporos, conídios, conidióforos e outras) e somáticas (micélio, clamidosporos, septos) foram observadas em lâminas (montadas com água ou azul de algodão com lactofenol) ao microscópio óptico comum. Para melhor observar o crescimento e o desenvolvimento das estruturas de reprodução e/ou dispersão utilizou-se a técnica do cultivo em lâmina (MYCOLOGY GUIDEBOOK COMMITTEE, 1970). Foram utilizadas duas variações dessa técnica: a primeira consistindo na simples colocação de uma lamínula esterilizada ao lado do inóculo fúngico, recém transferido para a placa-de-petri com meio específico (SMA) ou genérico (BDA). Na segunda (RIDDELL, 1950), foi utilizado um conjunto esterilizado de lâmina e lamínulas dentro de placas-de-petri em que a umidade foi mantida com um papel de filtro e/ou algodão hidrófilo, com solução de água esterilizada com glicerina a 2%. O fungo foi inoculado e cresceu dentro desse conjunto, em blocos quadrados pequenos, com no máximo 1cm² de área e 2-3cm de espessura de meio de cultura (SMA ou BDA). As culturas em lâmina foram incubadas em temperatura ambiente (20 a 25°C) de três a cinco dias, ou até o inóculo ter dado origem a colônias contendo as estruturas necessárias para identificação. A

esterilização de todo material utilizado e dos meios de cultura foi realizada na condição de 121°C, 1atm, durante 30min.

4.5. Parâmetros determinados durante a coleta de amostras de solo

4.5.1. Temperatura do ar (°C)

Durante as duas coletas, a temperatura do ar foi medida em cada ponto de coleta com auxílio de termômetro de mercúrio.

4.5.2. Temperatura do solo até 15cm de profundidade (°C)

Em cada ponto de coleta foi medida a temperatura do solo a 15cm de profundidade, com auxílio de termômetro de haste metálica.

4.5.3. Teor de umidade (%) do solo

Em cada ponto de coleta, uma alíquota da amostra composta de solo foi separada e acondicionada em uma lata pequena de alumínio, com capacidade de aproximadamente 10g (previamente tarada em balança semi-analítica e etiquetada). No laboratório, as amostras foram pesadas para determinar o peso úmido, antes de serem colocadas na estufa a 105°C por aproximadamente 48h, para a obtenção do peso seco. O teor de umidade foi calculado pela diferença entre o peso seco constante e o úmido, calculando-se a porcentagem de água do solo, com base no valor percentual hídrico sobre o peso seco (MCLEAN; COOK, 1968).

4.6. Inóculos

As soluções de esporos utilizadas nos ensaios de otimização dos protocolos para a extração de lipídeos foram preparadas adicionando-se 10mL de água filtrada (mili-Q) e esterilizada em um tubo de ensaio contendo as culturas de *Mucor* spp., em meio de cultura sólido inclinado e agitando-o vigorosamente com auxílio de um vórtex, durante aproximadamente um a dois minutos. Para contagem de esporos usou-se a câmara de Neubauer (Improved Bright-Line-Levy-Chamber, Cat. Nr. 500 Batch Counting Chamber, Hausser Scientific, 1/400SQmm, 1/10mm de profundidade). A suspensão de esporos ou conídios foi padronizada entre, aproximadamente, $4 \text{ e } 5 \cdot 10^7$ esporos/cm³.

4.7. Otimização dos protocolos para extração de lipídeos

4.7.1. Primeira modificação proposta

Foram conduzidos experimentos para avaliar a eficiência dos diversos protocolos e suas respectivas adaptações de extração de lipídeos de fungos baseados em Ruegger (2001) e modificações propostas baseadas na versão simplificada de Bligh e Dyer (1959), para a extração “clássica” de Folch et al. (1957).

A seguir encontra-se a técnica originalmente proposta por Ruegger (2001) para a extração de lipídeos. Cerca de 50mg da biomassa foi reidratada com adição de 2,0mL de água destilada. A esta suspensão foram adicionados 2,5mL de clorofórmio e 5,0mL de metanol em temperatura ambiente durante 24h, com agitações ocasionais. A solução extratora portanto foi constituída de mistura homogênea de água, clorofórmio e metanol (0,8:1,0:2,0 v/v). O material foi centrifugado a 2415G, por 11min, em tubos de vidro âmbar de 20mL com tampa de rosca. O extrato sobrenadante foi transferido com uma pipeta Pasteur para outro tubo onde foram adicionados mais 2,5mL de clorofórmio e mais 2,5mL de água destilada. A mistura foi agitada em vórtex e em seguida centrifugada a 340G, por 30min. A camada superior foi desprezada e a camada inferior ou seja, a fase contendo clorofórmio, foi cuidadosamente removida, com pipeta Pasteur e transferida para um tubo de ensaio âmbar, previamente tarado. O solvente foi removido em atmosfera de nitrogênio, em temperatura ambiente (RUEGGER, 2001).

O objetivo do primeiro experimento foi confrontar a metodologia de extração de lipídeos de fungos utilizada por Ruegger (2001), com metodologia parecida, mas com algumas modificações da técnica original que visaram otimizar o processo de extração. Na técnica original a biomassa úmida foi colocada diretamente na solução extratora constituída de água, clorofórmio e metanol (0,8:1,0:2,0 v/v) sem macerar o material, conforme descrito acima. Já na modificação aqui proposta, a biomassa foi macerada juntamente com solução extratora constituída de metanol-clorofórmio (2:1 v/v) com a ajuda de almofariz e pistilo e, posteriormente, foi adicionada água.

Para a obtenção de biomassa foram preparados 20 erlenmeyeres de 125mL com 50mL de meio de cultura líquido de extrato de malte a 2% e outros 18 erlenmeyeres de 250mL com 100mL do mesmo meio de cultura. Após a esterilização a 120°C a 1atm durante 30 minutos, os erlenmeyeres foram inoculados com, respectivamente, 0,04mL e 0,08mL de solução de esporos contendo $5,1 \cdot 10^7$ esporos/cm³ e incubados a 25°C em mesa agitadora com movimento orbital. As biomassas produzidas após 6 dias de cultivo foram filtradas com auxílio de bomba de vácuo e funil de Büchner, lavadas três vezes com água esterilizada, sob agitação a 150rpm

durante pelo menos 1 hora (cada agitação), para retirada de todo o resíduo de meio de cultura das biomassas.

Cinco amostras das biomassas crescidas em erlenmeyeres de 125mL foram utilizadas para se efetuar a extração do material seco. A desidratação deste foi realizada em dessecador sob vácuo, utilizando-se sílica gel como material secante. A extração se deu pelo método adaptado por Ruegger (2001) descrito acima.

Cinco amostras das biomassas crescidas em erlenmeyeres de 250mL foram congeladas e submetidas a metodologia de extração de lipídeos descrita. E outras cinco amostras, crescidas também em frascos de 250mL, tiveram suas biomassas maceradas juntamente com a solução extratora. As biomassas remanescentes foram pesadas depois de permanecerem durante 5 dias na estufa a 60°C, e mais um dia em dessecador com sílica gel para obtenção dos pesos secos (massa constante) para se calcular o fator de correção do peso aproximado das biomassas úmidas utilizadas na extração.

4.7.2. Segunda modificação proposta

O objetivo do segundo experimento foi comparar outras duas modificações propostas para a extração de lipídeos com a extração utilizada por Ruegger (2001). Esta última utiliza extração dos ácidos graxos do material fresco. Já na modificação proposta, a biomassa foi congelada e liofilizada com o objetivo das células serem rompidas e assim facilitar a extração dos lipídeos e também para facilitar a pesagem das biomassas. Na outra modificação proposta as biomassas foram tratadas duas vezes com solventes apropriados ao invés de uma vez como descrito na técnica original.

Foram preparados 24 erlenmeyeres de 125mL com 50mL de meio de cultura líquido de extrato de malte a 2% e outros 18 erlenmeyeres de 250mL com 100mL do mesmo meio de cultura. Após a esterilização a 120°C a 1atm durante 30 minutos, os erlenmeyeres foram inoculados com respectivamente 0,04mL e 0,08mL de solução de esporos contendo $4,54 \cdot 10^7$ esporos/cm³ e incubados a 25°C em mesa agitadora com movimento orbital durante 6 dias.

As biomassas previamente lavadas e filtradas (conforme a metodologia descrita acima) de 12 erlenmeyeres de 250mL e de 6 erlenmeyeres de 125mL foram transferidas para tubos, de vidro âmbar de 20mL com tampa de rosca, previamente tarados, e congeladas durante aproximadamente 18h. O congelamento foi realizado para facilitar a liofilização do material. Em seguida, o material foi liofilizado em equipamento da marca Jouan LP3 e também em outro equipamento da marca Termo Savant Micro ModulgoY-0115. Este processo durou

cerca de 4 a 6h; após esse tempo, os tubos contendo a biomassa foram pesados para obtenção de peso seco. Repetiu-se duas vezes a extração de lipídeos com as soluções extratoras em 3 amostras crescidas nos erlenmeyeres de 125mL e em 6 amostras crescidas nos frascos de 250mL.

Na primeira extração adicionou-se 1,16mL de água destilada, 1,45mL de clorofórmio e 2,9mL de metanol, obedecendo a proporção original dos solventes (0,8:1,0:2,0 v/v) aos tubos âmbar, contendo as biomassas, que foram deixados a temperatura ambiente durante 24h, com agitações ocasionais usando-se vórtex. A solução extratora foi removida depois de centrifugação a 2415G, por 11min e disposta em outros tubos de cor âmbar.

Na segunda extração foram adicionadas as mesmas biomassas mais 0,84mL de água, 1,05mL de clorofórmio e 2,10mL de metanol, novamente obedecendo a proporção original dos solventes (0,8:1,0:2,0 v/v), permanecendo esta solução em contato com as biomassas por mais uma hora. Os tubos foram novamente centrifugados e o extrato sobrenadante da segunda extração de cada tubo transferido com uma pipeta Pasteur para os outros tubos correspondentes que continham o extrato da primeira extração. A estes tubos contendo as duas extrações foram adicionados mais 2,5mL de clorofórmio e mais 2,5mL de água destilada. A mistura foi agitada em vórtex e em seguida centrifugada a 340G, por 30min. A camada superior foi desprezada e a camada inferior contendo clorofórmio, removida, com pipeta Pasteur, e transferida para um tubo de 5mL âmbar com rosca, previamente tarado. O solvente foi removido em atmosfera de nitrogênio, em temperatura ambiente.

As biomassas de três amostras crescidas em erlenmeyeres de 125mL e seis em outros frascos com capacidade de 250mL foram submetidas ao processo de extração, apenas uma vez, conforme a técnica descrita no primeiro experimento. As biomassas remanescentes foram pesadas depois de permanecerem durante 5 dias na estufa a 60°C, e mais um dia em dessecador com sílica gel, para comparação de seus pesos com aqueles obtidos das biomassas liofilizadas, para se otimizar o cálculo do fator de correção do peso aproximado das biomassas, estas utilizadas úmidas em outros experimentos.

4.7.3. Terceira modificação proposta

Esse experimento é complementar a primeira modificação proposta. Na extração utilizada por Ruegger (2001) o material foi colocado úmido e sem fragmentação, diretamente na solução extratora. Na técnica modificada, o material foi macerado juntamente com a solução extratora. As biomassas crescidas em 24 erlenmeyeres de 125mL, e 18 crescidas em

erlenmeyeres de 250mL previamente congeladas, foram submetidas ao seguinte tratamento: em cinco réplicas dos erlenmeyeres de 125mL e três triplicatas das biomassas crescidas em erlenmeyeres de 250mL os lipídeos foram extraídos conforme Ruegger (2001). Em outras cinco réplicas das biomassas crescidas em erlenmeyeres de 125mL e três triplicatas das crescidas em erlenmeyeres de 250mL, estas foram submetidas à maceração. A seguir, utilizou-se o mesmo protocolo citado por Ruegger (2001), com a única diferença de macerar a biomassa juntamente com a solução extratora. As biomassas remanescentes foram pesadas depois de permanecerem durante 5 dias a 60°C, e mais um dia em dessecador com sílica gel, para comparação de seus pesos com aqueles obtidos das biomassas remanescentes dos outros experimentos, para o cálculo do fator de correção do peso aproximado das biomassas produzidas.

4.7.4. Determinação dos ácidos graxos poliinsaturados

O potencial de produção de ácidos graxos poliinsaturados (AGL e AA) e ainda a quantidade total de lipídeos foram verificados em 11 linhagens de *Mucor* sp. isoladas do solo de área de cerrado. Estas linhagens foram escolhidas por pertencerem ao grupo dos fungos Zigomicetos que conforme a literatura são bons produtores de AGL (RATLEDGE,1991; GUNSTONE, 1992; WEETE; GANDHI, 1992; SANCHOLLE; LÖSEL, 1995; EMELYANOVA,1997; WEETE et al., 1998; CERTIK; SHIMIZU, 1999; GEMA et al., 2002; DYAL; NARINE, 2005; WARD; SINGH, 2005). As linhagens de *Mucor* spp. comparadas foram as seguintes: M1; M5; M59; M123; M131; M132; M133; M134; M230; M260; e MX.

As biomassas destas linhagens foram obtidas em erlenmeyeres de 125mL contendo 50mL de meio de cultura líquido de extrato de malte a 2%, e em erlenmeyeres de 250mL, contendo 100mL do mesmo meio de cultura. As melhores linhagens produtoras dos ácidos graxos estudados também foram cultivadas no mesmo meio de cultura suplementado com óleo de girassol a 2%, em frascos erlenmeyeres com capacidade de 125mL. Os frascos erlenmeyeres contendo os meios de cultura foram esterilizados a 120°C a 1atm, durante 30min, inoculados com 0,032%v/v (com 0,04mL em frascos de 125mL e 0,08mL em frascos de 250mL) de solução de esporos (em torno de $4-5 \cdot 10^7$ esporos/cm³) das linhagens mencionadas, incubados a 25-26°C, durante 6 dias em mesa agitadora com movimento orbital. As biomassas produzidas foram filtradas a vácuo, e lavadas três vezes com água esterilizada ultrapura (Mili-Q), sob agitação a 150rpm durante uma hora (cada agitação) para retirar todo resíduo de meio de cultura.

As biomassas foram transferidas imediatamente para tubos de cor âmbar de 15 e/ou 20mL previamente tarados e em seguida liofilizadas durante um período aproximado de 8-10h. Os tubos contendo as biomassas foram pesados ao final do processo para obtenção do peso seco das mesmas. Diretamente em cada tubo âmbar, contendo o micélio produzido, foi adicionada uma solução de 2,0mL de água destilada, 2,5mL de clorofórmio e 5,0mL de metanol (0,8:1,0:2,0 v/v) para extração dos ácidos graxos da biomassa, que permaneceu submersa nesta solução extratora durante 24h, com agitações ocasionais. O extrato sobrenadante foi transferido com uma pipeta Pasteur para outro tubo de cor âmbar. Foram adicionados mais 2,5mL de clorofórmio e 2,5mL de água destilada à biomassa contida nos primeiros tubos, que permaneceu na solução extratora durante duas horas. O extrato foi recolhido e adicionado ao primeiro, contido em tubo de cor âmbar que foi então agitado com vórtex durante 1min.

A mistura depois de homogeneizada permaneceu em repouso, em local isento de luz a 20°C, até o aparecimento de duas fases distintas. Depois de pelo menos 1h após a separação das fases, a camada superior foi desprezada usando-se uma pipeta Pasteur ligada por um tubo de borracha a uma bomba á vácuo, o que facilitou e agilizou os experimentos. A camada inferior, que contém o clorofórmio, foi cuidadosamente removida com pipeta Pasteur e transferida para um tubo âmbar de 5mL com rosca, previamente tarado.

O solvente foi evaporado sob fluxo moderado de nitrogênio, em temperatura ambiente e local com pouca luminosidade para evitar degradação dos compostos a serem analisados. Calculou-se a quantidade de lipídeos totais extraídos pelo peso dos extratos, que foram imediatamente após a pesagem novamente dissolvidos em 1mL de hexano para evitar degradação dos ácidos graxos de interesse neste estudo.

4.8. Experimento em biorreator de vidro

Foi utilizado um biorreator de vidro encamisado com agitador e capacidade para 2L para se estudar a produção de lipídeos utilizando-se as três melhores linhagens produtoras dos mesmos, escolhidas de acordo com os resultados dos experimentos anteriores em frascos erlenmeyeres. O volume de meio de cultura foi estabelecido para 1L de extrato de Malte a 2%, deste 50mL (5%v/v) foram separados para a preparação do inóculo. Este foi preparado a partir de 3 tubos de 15mL, contendo as linhagens em cultura sólida, adicionando-se o meio de cultura líquido por diversas vezes aos mesmos e agitando os com vórtex, para obtenção da solução de esporos. As mesmas três linhagens também foram crescidas, em condições parecidas de cultivo mas com a adição de óleo de girassol a 2% no meio de cultura. As condições de cultivo durante os 6 dias de crescimento foram: 25-26°C, agitação a 132rpm, e ar filtrado a $120\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ ($2\text{v}\cdot\text{vm}^{-1}$).

4.9. Preparação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos e sua análise por cromatografia gasosa.

As amostras de lipídeos das biomassas das linhagens estudadas após serem novamente dissolvidas em 1mL de hexano foram esterificadas para a análise em cromatógrafo. Para isso, aos extratos foram adicionados 50 μL de solução de hidróxido de sódio metanólico (2M). A mistura foi agitada por aproximadamente 30s e deixada em repouso durante 30min. Após esse tempo, à mistura foi adicionada cerca de 100mg de cloreto de cálcio anidro, para retirada de qualquer traço de água, que poderia danificar a coluna ou incorrer em erros na leitura da corrida. A amostra foi então centrifugada a 2415G, por 8min. A fase superior foi injetada no cromatógrafo a gás Finnigan–Tremetrics, modelo 9001, em coluna FFAP (“free fatty acid polimerase”) Megabore de 30m, para análise.

A cromatografia gasosa foi realizada utilizando-se filme de 1mm com as seguintes especificações: fluxo de hidrogênio de $20\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; fluxo de nitrogênio de $25\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; fluxo de ar sintético de $175\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; o gás de arraste foi o hidrogênio; pressão de trabalho de 4psi; temperatura do injetor de 210°C; temperatura do detector de 250°C; divisão da amostra de 10:1; temperatura inicial da coluna de 50°C por 1min, com programação de subir 45°C por minuto até 190°C, depois subindo 4°C por minuto até 198°C, em seguida subindo mais 2°C por minuto até chegar a 222°C, ficando nessa temperatura por 3min., e finalmente subir 10°C por minuto, ficando durante 5min na temperatura máxima de 230°C.

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação do tempo de retenção (que especifica o ácido graxo) e a área sob os picos dos componentes das amostras (que pode ser usada para determinar as quantidades do ácido na amostra), com aqueles obtidos a partir de padrões dos ésteres metílicos dos ácidos graxos. Foram preparadas amostras para contendo concentrações diferentes dos padrões dos ésteres metílicos do AGL e do AA, para a confecção de uma curva de calibração.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No local de estudo em questão, anteriormente foram realizados estudos relacionados com a adição de vinhaça ao solo e sua influência sobre a ecologia dos microrganismos (TAUK-TORNISIELO; RUGGER, 1987; PALMA, 1988; TAUK, 1987, 1990; SCHOENLEIN-CRUSIUS; TAUK, 1991, TAUK-TORNISIELO; MALAGUTTI, 1997), estudos de sucessão fúngica e velocidade de decomposição da serapilheira (ATTILI, 1989), distribuição de fungos filamentosos e actinomicetos no perfil do solo (RAYMUNDO JR, 1992) e a contribuição da serapilheira no processo de humificação do solo (RAYMUNDO JR, 1999).

5.1. Fatores Abióticos

De acordo com a carta de chuvas fornecida pela estação Meteorológica de Rio Claro, CEAPLA-IGCE-UNESP, a última precipitação anterior ao dia de coleta ocorreu somente no dia 23 de maio de 2002 com 0,5mm de chuva. No mês seguinte de junho não houve nenhuma precipitação. Situação que se manteve até depois do dia da primeira coleta, portanto o dia da primeira coleta foi realizado no período de estiagem (inverno). Já no dia da segunda coleta (28 março de 2003) verifica-se uma precipitação de 3,0mm, o total de precipitação deste mês foi de 96,9mm e o do mês anterior (fevereiro) de 113,3mm, situando portanto o dia da segunda coleta na época de chuvas (verão).

Verifica-se que no dia da primeira coleta efetuada na época de estiagem (inverno) foram registradas as maiores médias da temperatura do ar e temperatura do solo, sendo estas maiores nos pontos 3 e 4 (Figura 3). No dia da segunda coleta realizada na época de chuvas (verão) ocorreram as maiores médias de umidade do ar. Já em relação a umidade do solo, as maiores médias foram obtidas na primeira coleta (inverno) sendo maiores nos pontos 1 e 2, com exceção do ponto 4 na segunda coleta (verão) que teve a maior média. Apesar de chover mais no verão, o sol pode incidir em alguns pontos mais fortemente evaporando mais rapidamente a água nestas regiões do que naquelas que se situam em áreas sombreadas.

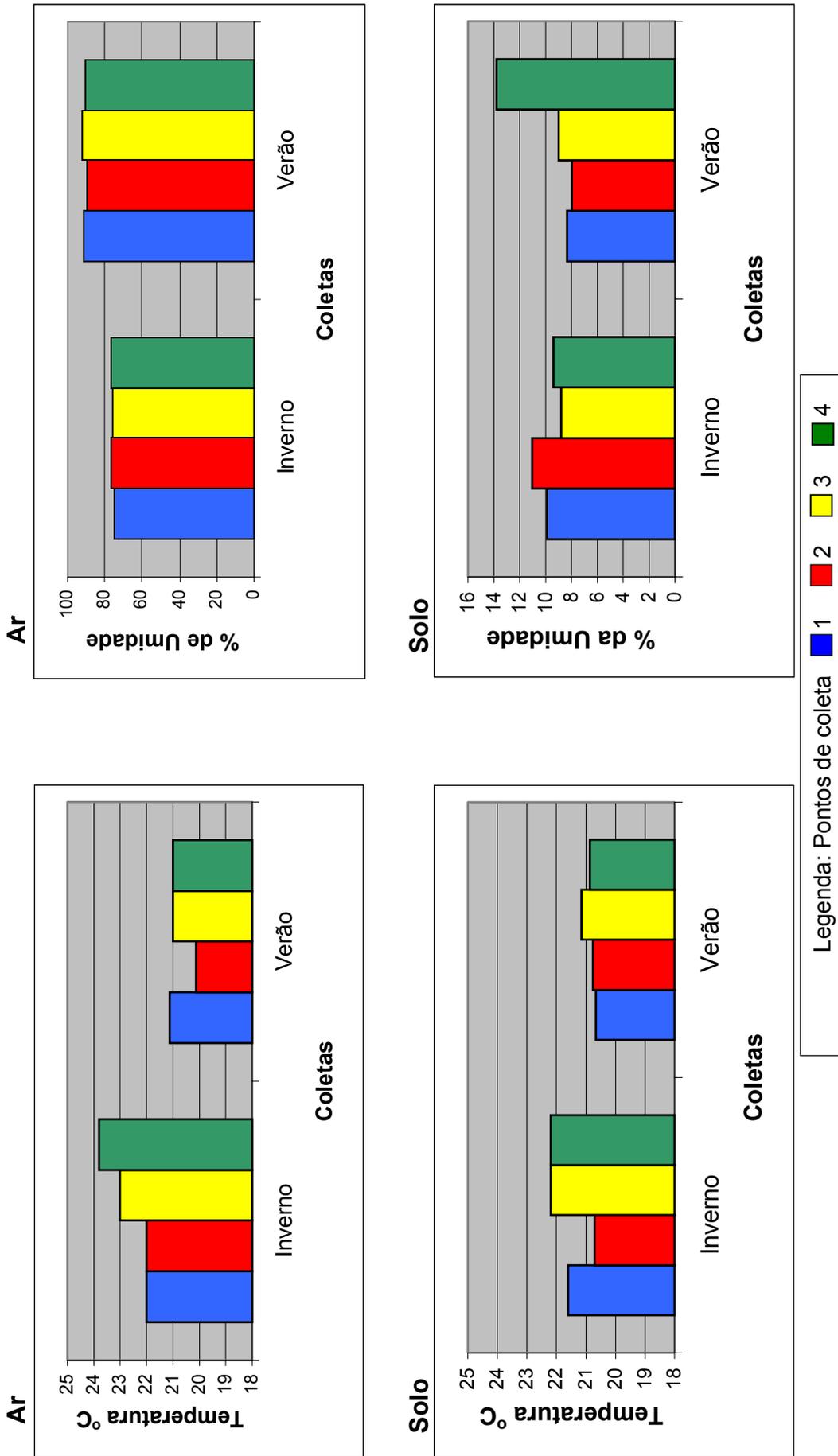


Figura 3. Parâmetros abióticos determinados durante a coleta de solo em quatro pontos com três sub-amostras cada, da área de cerrado, realizada na época de estiagem no município de Corumbataí.

5.2. Número total de colônias

Na época chuvas foram observados os maiores números de colônias fúngicas, sobre as placas-de-petri utilizando-se a técnica da diluição em série, chegando a $8,97 \cdot 10^5$ UFC/g de solo seco no meio MM, somando-se as médias das triplicatas dos quatro pontos juntos (Figura 4). Com essa técnica no período de chuvas (verão) os meios de cultura em que se encontraram os maiores números de unidades formadoras de colônias (UFC) por ordem decrescente tomando-se as médias das triplicatas somando-se os quatro pontos foram: BDA ($3,85 \cdot 10^5$ UFC/g de solo seco), MMar ($4,76 \cdot 10^4$ UFC/g de solo seco), SMA ($2,48 \cdot 10^4$ UFC/g de solo seco). No inverno, época de estiagem, com a técnica da diluição em série os maiores números de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de solo seco na ordem decrescente tomando-se as médias das triplicatas somando-se os quatro pontos foram encontrados nos meios: SMA ($7,18 \cdot 10^5$ UFC/g de solo seco), SMA+a ($2,93 \cdot 10^5$ UFC/g de solo seco), MM+a ($1,82 \cdot 10^5$ UFC/g de solo seco), MMar ($4,73 \cdot 10^4$ UFC/g de solo seco) e BDA+a ($4,51 \cdot 10^4$ UFC/g de solo seco).

Na segunda coleta optou-se por não se utilizar os meios adicionados de antibiótico pois no inverno esse acréscimo demonstrou restringir o número de colônias fúngicas provavelmente não diretamente mas indiretamente, demonstrando haver correlações entre os fungos e bactérias restringidas pelo acréscimo do mesmo.

Nas duas coletas, os dados dos números de UFC por grama de solo seco, somando-se as médias das triplicatas dos quatro pontos e também somando –se os dados obtidos dos diferentes meios de cultura no geral foram menores utilizando-se a técnica da placa de solo modificada quando comparados com os valores da técnica da diluição em série.

Com a técnica da placa de solo, modificada, na qual se realizou o plaqueamento de superfície de uma solução de solo diluída (10^{-2}), o maior número de UFC por grama de solo seco foi encontrado também no meio MM mas na primeira coleta (inverno) com $6,57 \cdot 10^4$ UFC/g de solo seco (Figura 5). Os números da soma das médias dos quatro pontos desse índice, na primeira coleta nos diferentes meios de cultura foram em ordem decrescente: MMar ($5,13 \cdot 10^4$ UFC/g de solo seco), BDA ($4,42 \cdot 10^4$ UFC/g de solo seco), BDA+a ($4,22 \cdot 10^4$ UFC/g de solo seco), MM+a ($3,48 \cdot 10^4$ UFC/g de solo seco), SMA ($1,68 \cdot 10^4$ UFC/g de solo seco) e SMA+a ($1,63 \cdot 10^4$ UFC/g de solo seco). Na segunda coleta (verão) foram observados os menores números de UFC por grama de solo seco. Os meios de cultura em que se encontraram esses valores em ordem decrescente somando-se as médias das triplicatas de todos os pontos foram: MMar ($3,19 \cdot 10^4$ UFC/g de solo seco), MM ($2,19 \cdot 10^4$ UFC/g de solo seco), BDA ($1,53 \cdot 10^4$ UFC/g de solo seco), e SMA ($6,21 \cdot 10^3$ UFC/g de solo seco).

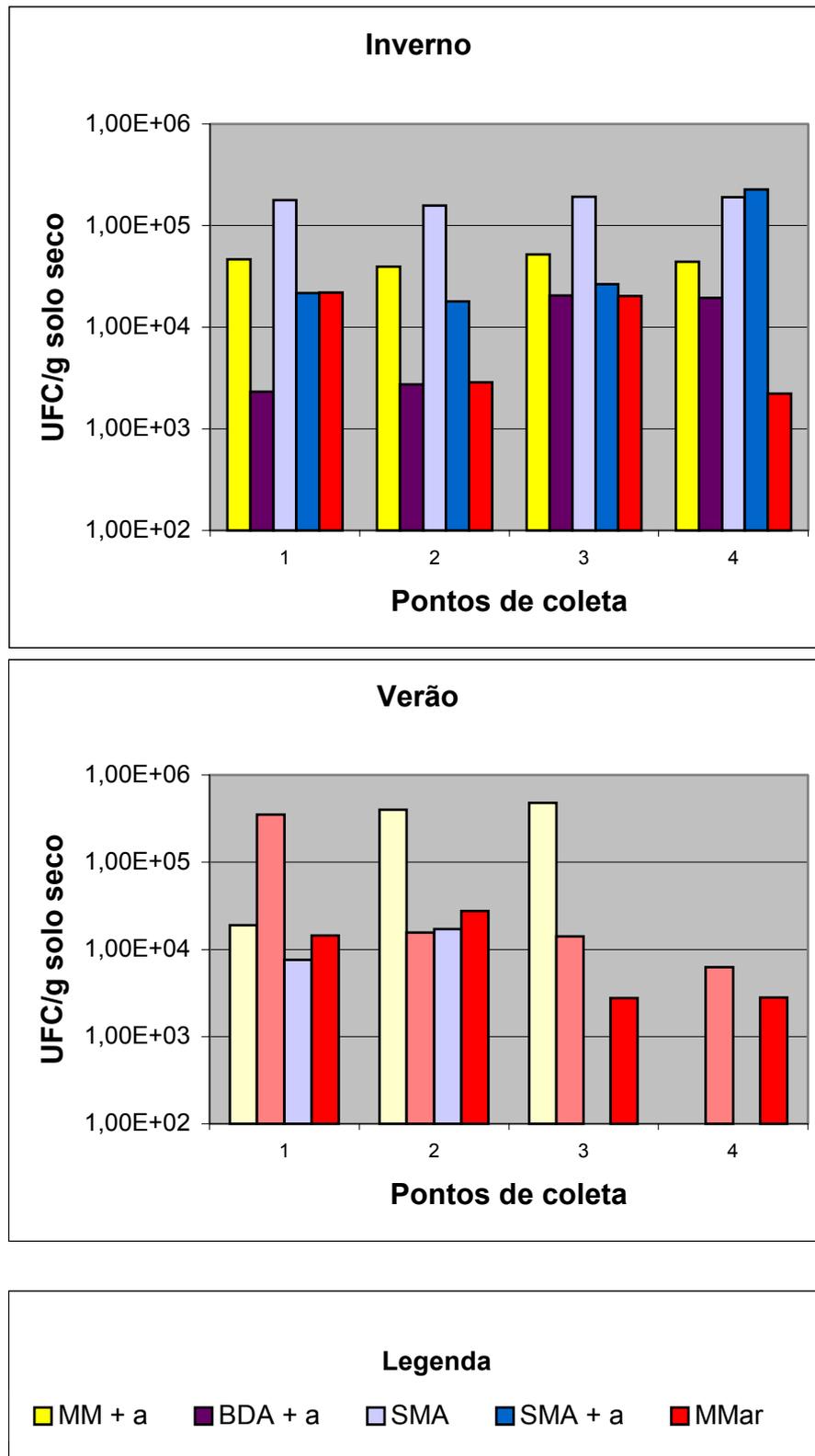


Figura 4. Número de UFC/g de solo seco, contadas após 5 dias de crescimento em placas-de-petri contendo diferentes meios de cultura (MM=malte, BDA=batata-dextrose-ágar, SMA=ágar sintético para *Mucor*, MMar=Martin, a=antibiótico) isoladas de 0-15cm de profundidade do solo da reserva de Corumbataí através da técnica da diluição em série (CLARK, 1965) na época de estiagem (inverno) e na época chuvosa (verão).

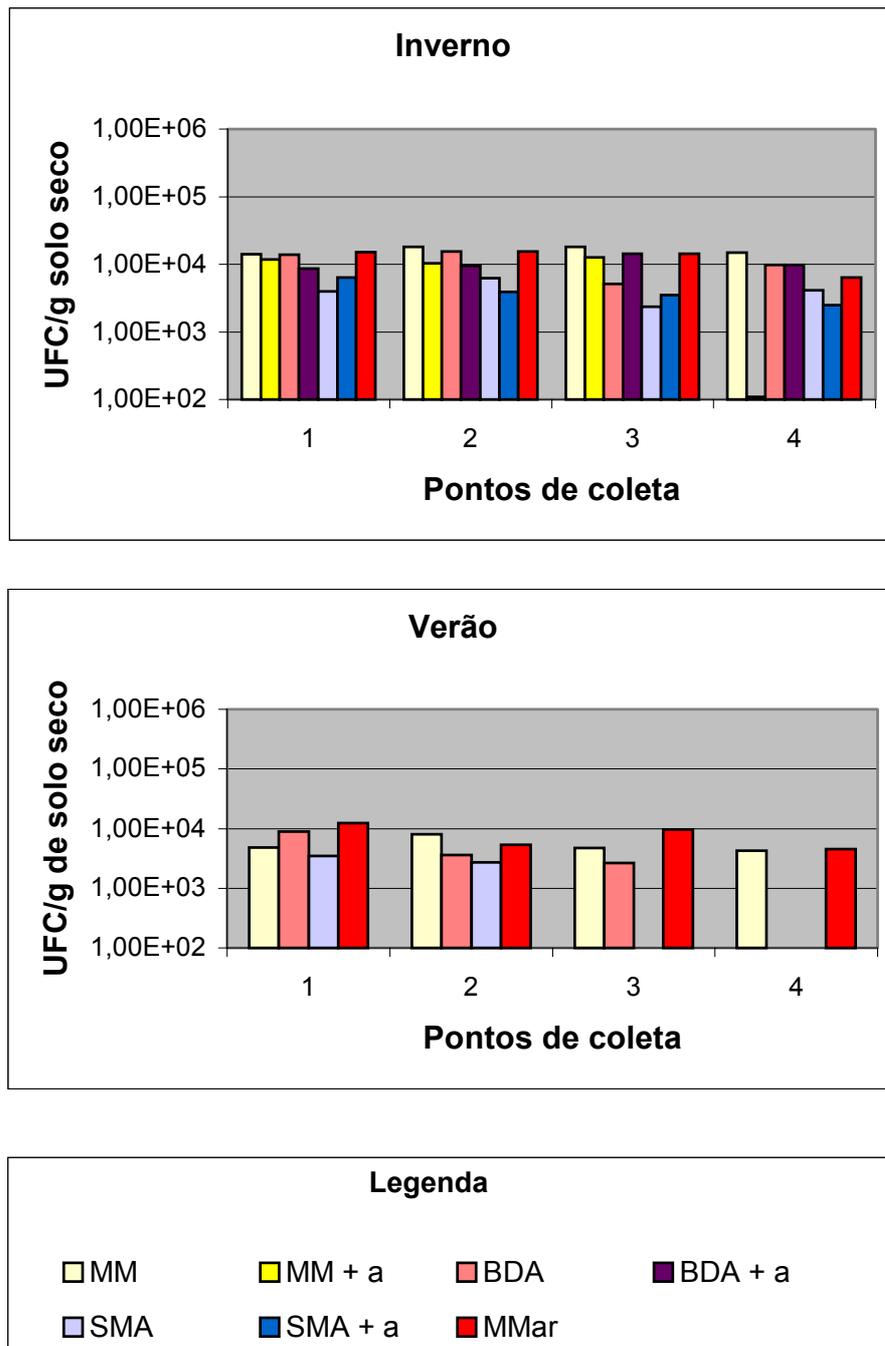


Figura 5. Número de UFC/g de solo seco, contadas após 5 dias de crescimento em placas-de-petri contendo diferentes meios de cultura (MM=malte, BDA=batata-dextrose-ágar, SMA=ágar sintético para *Mucor*, MMar=Martin, a=antibiótico) isoladas de 0-15cm de profundidade do solo da reserva de Corumbataí através da técnica da placa-de-solo (WARCUP, 1950-modificada) na época de estiagem (inverno) e na época chuvosa (verão).

Alguns dados podem ter sido subestimados ou interpretados erroneamente pelo fato das colônias de bactérias e leveduras crescerem em velocidade maior e se sobreporem às colônias fúngicas dificultando tanto seu crescimento quanto sua visualização para contagem. A descontinuidade do uso de antibiótico na segunda coleta poderia levar a falsas suposições sobre o número de UFC por grama de solo seco. Aparentemente, não houve muitas diferenças significativas entre os pontos de coleta.

5.3. Táxons isolados

As colônias purificadas foram repicadas para tubos, contendo os respectivos meios de cultura específicos e armazenados a 5°C, para posterior identificação utilizando-se literatura especializada (DOMSCH et al. 1980; SCHIPPER, 1973). Foram isoladas 267 linhagens considerando-se as duas coletas (Tabela 1). O gênero *Penicillium* foi predominante nas duas coletas realizadas neste estudo.

Tabela 1. Isolados, identificados a nível de gênero, do solo de cerrado do município de Corumbataí na época de estiagem (inverno, 2002) e de chuvas (verão, 2003) (X=ocorrência).

Fungos	Inverno				Verão			
	Pontos de coleta				Pontos de coleta			
	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>Aspergillus</i> sp.	X							
<i>Cilindrocladium scoparium</i> Morgan				X				X
<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedjin					X			
<i>Fusarium</i> sp.		X		X				
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer								X
<i>Mucor</i> sp.	X	X			X	X	X	
<i>Paecilomices</i> sp.						X	X	
<i>Penicillium</i> sp.	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Rhizopus</i> sp.							X	
<i>Trichoderma</i> sp.	X	X	X	X	X	X	X	X
Fungos não identificados	X	X	X	X	X	X	X	X
Total de fungos por pontos	20	27	39	24	21	48	38	28
Fungos contaminados			18				4	
Total de fungos por coletas			128				139	
Total geral								267

Na primeira coleta foram isoladas 128 linhagens, sendo que 18 isolados foram perdidos, pois apresentaram contaminação. O meio de cultura BDA proporcionou o isolamento de 5 táxons e quando acrescido de antibiótico acarretou o isolamento de 17 táxons. O MM acrescido com antibiótico proporcionou isolamento de 6 táxons e o MMar propiciou o isolamento de 55 fungos. O meio SMA possibilitou o isolamento de 20 táxons, e este

acrescido de antibiótico permitiu o isolamento de 4 táxons. Somente um fungo foi isolado adequadamente na técnica da diluição com a diluição a 10^{-1} , 3 fungos foram isolados na diluição 10^{-2} , 23 fungos foram isolados na diluição 10^{-3} e 68 foram isolados na diluição 10^{-4} . Com a técnica da placa de solo foram isoladas 13 linhagens de fungos. No ponto 1 foram isoladas 20 linhagens de fungos; no ponto 2, 27 linhagens; no ponto 3, 39 linhagens e no ponto 4, 24 linhagens de fungos.

Na segunda coleta, foram isoladas no total 139 linhagens de fungos, sendo que 4 delas apresentaram contaminação. Nesta coleta, o BDA propiciou o isolamento de 5 táxons bem como o MM. O MMar possibilitou o isolamento de 112 linhagens de fungos e o SMA, 13 linhagens de fungos. Nessa coleta também não foi possível isolar linhagens de fungos apropriadamente com a técnica de diluição, nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} . A mesma técnica resultou no isolamento de 53 linhagens de fungos na diluição 10^{-3} , e 77 fungos na diluição 10^{-4} . As diluições maiores da técnica da diluição em série foram mais eficientes em isolar os fungos, facilitando sua purificação por dispersar consideravelmente as colônias de fungos, evitando-se assim a contaminação entre as mesmas. A técnica da placa de solo somente acarretou o isolamento de 5 linhagens de fungos. Os isolamentos de poucas linhagens de fungos, com a técnica da placa de solo e nas primeiras diluições da técnica da diluição, provavelmente, foram devido à proliferação acentuada de bactérias que impossibilitou o correto isolamento das linhagens. No ponto 1 foram isoladas 20 linhagens de fungos, no ponto 2 foram isoladas 48 linhagens, no ponto 3, 38 linhagens e no ponto 4 foram isoladas 28 linhagens de fungos.

Observou-se a ausência ou a raridade de fungos considerados cosmopolitas (*Aspergillus*, *Fusarium*). Alguns representantes destes gêneros até apareceram nas placas, mas devido a proliferação muito rápida de espécies competidoras foi inviável seu correto isolamento.

Na segunda coleta efetuada no verão houve uma proliferação muito rápida e acentuada de bactérias que acabaram por mascarar a presença dos fungos. O tempo de geração das bactérias é muitas vezes menor do que a dos fungos e como consequência, as colônias destes cresceram mais lentamente, dificultando a contagem correta das colônias dos fungos. O número de linhagens de fungos da segunda coleta, portanto, foi subestimado. Os valores de umidade também podem ter influenciado os resultados de isolamento em relação aos pontos de coleta. Tanto na primeira, como na segunda coleta, foi isolado um número maior de linhagens de fungos, nos pontos onde houve menor valor da umidade do solo.

Os resultados das quantidades de colônias também mostraram uma tendência parecida no inverno, no ponto 3, que apresentou a umidade do solo mais baixa, além de conter maior número de fungos isolados. Este ponto também apresentou maior número de colônias na técnica da placa-de-solo. Tais resultados aqui encontrados podem ser discutidos de modo tendencioso, pois vários deles não puderam ser obtidos em decorrência da alta contaminação bacteriana.

O solo notoriamente é um sistema difícil de trabalhar, e técnicas para a investigação da micota do solo estão longe de serem ideais. O consórcio de técnicas e combinação de vários meios de cultura podem minimizar os erros das mesmas, contudo, ainda não se pode obter todos os fungos do solo que são ativos e realmente presentes, por ser difícil de se repetir as condições reais encontradas no solo para todas populações microbianas aí presentes (FRANKLAND, 1990).

Garret, disse sobre os fungos do solo, em 1952, que “nós vemos o que não podemos identificar e identificamos o que não podemos ver” (FRANKLAND, 1990). Essa afirmação até os dias de hoje ainda soa verdadeira. Muitas vezes vemos micélios no solo que nunca aparecem nas placas-de-petri e identificamos colônias sem saber sua real origem. À primeira vista, muitas hifas são idênticas morfológicamente e as fases ativas, dormentes ou mesmo mortas são indistintas. Como são materiais de dimensões microscópicas e muito frágeis, as dificuldades técnicas de se isolar os fungos do solo realmente presentes e ativos é enorme. Se por um lado não podemos isolar eficientemente as hifas, diretamente do solo ou de materiais orgânicos presentes dentro ou sobre este, por outro podemos induzir seu crescimento para formar colônias visíveis sobre um meio de cultura. A técnica da diluição em série, tem seus usos em estudos comparativos, mas favorece os esporos mais pesados. Uma das melhores alternativas para se obter um panorama geral, mas não completo, da micota do solo é a técnica de placa de solo (WARCUP, 1950, 1951). Este procedimento evita a perda de inóculo que ocorre com a diluição das amostras, as bactérias são restringidas por um certo grau de impenetrabilidade do ágar e as hifas ativas têm a chance de crescerem primeiramente que esporos germinados (FRANKLAND, 1990).

Para se isolar eficientemente os fungos com menor índice de contaminação, a técnica da diluição é mais vantajosa, pois permite que as colônias fiquem mais dispersas, evitando contaminação de uma por outra encontrada na mesma placa, portanto, facilitando o trabalho na purificação das colônias. O número de contaminações por bactérias e leveduras parece ser também mais baixo, pelo fato de diluir os contaminantes.

5.4. Avaliação das modificações propostas para a metodologia de extração de ácidos graxos

As técnicas que resultaram na extração das maiores quantidades médias AGL (Tabela 2) consistiram na original em que os lipídeos das biomassas secas, crescida em erlenmeyeres de 125mL, foram extraídos somente uma vez pelos solventes (média de $199,28\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e aquela onde as biomassas produzidas em erlenmeyeres de 125mL foram utilizadas úmidas e maceradas juntamente com a solução extratora ($199\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Essa mesma modificação da técnica original resultou em maior quantidade deste ácido graxo na biomassa ($93,02\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) quando esta foi congelada e macerada. Menor quantidade deste ácido na biomassa foi observado quando esta, crescida em erlenmeyeres de 250mL foi usada úmida e macerada ($15,72\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), porém o menor rendimento ocorreu na técnica onde a biomassa foi congelada e a extração foi da forma tradicional ($32,07\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Tabela 2. Valores das concentrações médias (n=3-6) de ácido γ -linolênico (AGL $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e ácido araquidônico (AA $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) no meio de cultura, quantidades desses ácidos graxos ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) e a quantidade de lipídeos totais (%) em relação ao peso seco da biomassa (AGL e AA $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) de *Mucor* sp. (Linhagem M131) confrontando várias modificações da técnica de extração de lipídeos originalmente proposta por Ruegger (2001).

Blocos	Meio de Cultura	Biomassa	Tipo de Extração	AGL $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	AGL $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	AA $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	AA $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	% de óleo
1	50mL	seca	Tradicional	199,28	78,10	1,93	0,74	60,86
	100mL	congelada	Tradicional	32,07	17,29	0,24	0,13	29,84
	100mL	úmida	Maceração	36,19	15,72	0,48	0,20	19,74
2	50mL	Liofilizada	1 vez	81,62	39,85	0,23	0,11	4,17
	50mL	Liofilizada	2 vezes	132,54	80,91	0,55	0,35	12,08
	100mL	Liofilizada	1 vez	89,29	46,47	0,46	0,24	16,84
	100mL	Liofilizada	2 vezes	116,09	62,95	0,84	0,45	33,30
3	50mL	Congelada	Tradicional	180,69	85,74	1,18	0,56	15,13
	50mL	Congelada	Maceração	199,00	93,02	1,45	0,68	16,68
	100mL	Congelada	Tradicional	101,53	52,05	0,87	0,45	9,49
	100mL	Congelada	Maceração	112,66	57,44	1,46	0,73	13,60

A biomassa foi crescida em erlenmeyeres de 125mL e de 250mL com respectivamente 50mL e 100mL de solução aquosa de extrato de malte a 2%, a 26°C, durante 6 dias, sob agitação.

A escolha da mistura de solventes foi estabelecida com base na literatura (FOLCH et al., 1957; BLIGH; DYER, 1959; CHRISTIE, 1982; KATES, 1982; GUNSTONE, 1996, SOMASHEKAR et al., 2001). Em condições de laboratório a maioria dos lipídeos é extraída por várias combinações de clorofórmio e metanol, enquanto que industrialmente se utiliza o hexano (CERTIK; SHIMIZU, 1999).

O sistema de solventes ideal para se extrair lipídeos das células microbianas precisa ser o suficientemente polar para remover todos os lipídeos das membranas celulares. Ao mesmo tempo o solvente não pode ser muito polar para que dissolva todos os lipídeos apolares (SOMASHEKAR et al., 2001). Somashekar et al. (2001) evidenciaram em um experimento testando a eficiência de três métodos de extração de lipídeos para a determinação da composição dos ácidos graxos de seis culturas de fungos, que a mistura de clorofórmio-metanol foi a melhor para a extração.

A utilização do hexano para se redissolver a amostras foi escolhida, pois os outros solventes como clorofórmio podem influenciar nos resultados ao permanecerem em contato prolongado com as mesmas. A determinação da composição de ácidos graxos dos lipídeos por cromatografia gasosa é precedida pela esterificação ou transesterificação destes, catalisada por base. Os ésteres metílicos formados são mais voláteis e, conseqüentemente, proporcionam análises mais adequadas.

Analisando-se os blocos dos experimentos (Figura 6) pode se constatar que as modificações aqui propostas da técnica original de extração de lipídeos proposta por Ruegger (2001), no geral, foram mais eficientes em extrair o ácido γ -linolênico da biomassa fúngica de *Mucor* sp. crescido em meio de cultura líquido de extrato de malte a 2%, durante 6 dias.

No primeiro experimento onde foi confrontada a extração da biomassa inteira e úmida conforme a técnica original e seca conforme uma adaptação, diretamente com solventes e ainda com outra modificação que consistiu na maceração da biomassa juntamente com os solventes. A modificação em que a biomassa foi seca mostrou ser a mais eficiente para extração do AGL e também do AA (Figura 7). Quando foram comparadas as médias somente da concentração de AGL, em relação ao meio de cultura entre as biomassas crescidas nos erlenmeyeres de 250mL, a maceração se mostrou ligeiramente mais eficiente. A média das quantidades de ácido γ -linolênico (AGL $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) foi ligeiramente maior quando a biomassa não foi macerada, mas congelada. Ainda, comparando-se somente as biomassas dos erlenmeyeres maiores, a maceração extraiu mais AA do que a técnica em que se congelou a biomassa.

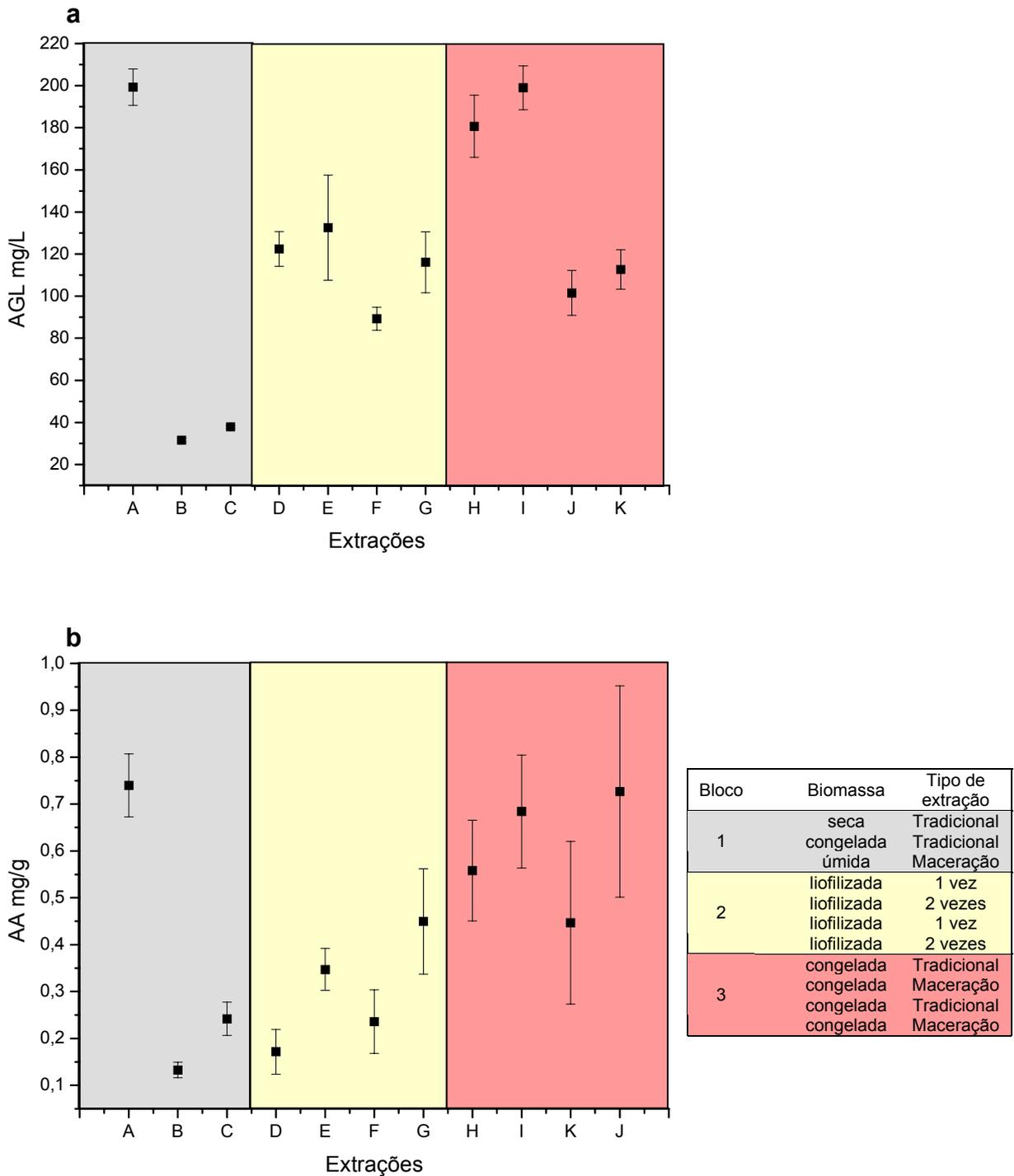


Figura 6. Valores médios (■) das concentrações (n=3-6) e desvio padrão de ácido γ -linolênico e no meio de cultura (AGL mg/L) (a), quantidade desse ácidos graxos em relação ao peso seco da biomassa (AGL mg/g) (b) de *Mucor* sp. (Linhagen M131) confrontando várias modificações da técnica de extração de lipídeos originalmente proposta por Ruegger (2001). A biomassa foi crescida em erlenmeyeres de 125mL e de 250mL com respectivamente 50mL (A,D,E,H,I) e 100mL (B,C,F,G,J,K) de solução aquosa de extrato de malte a 2%, sob agitação durante 6 dias a 25°C.

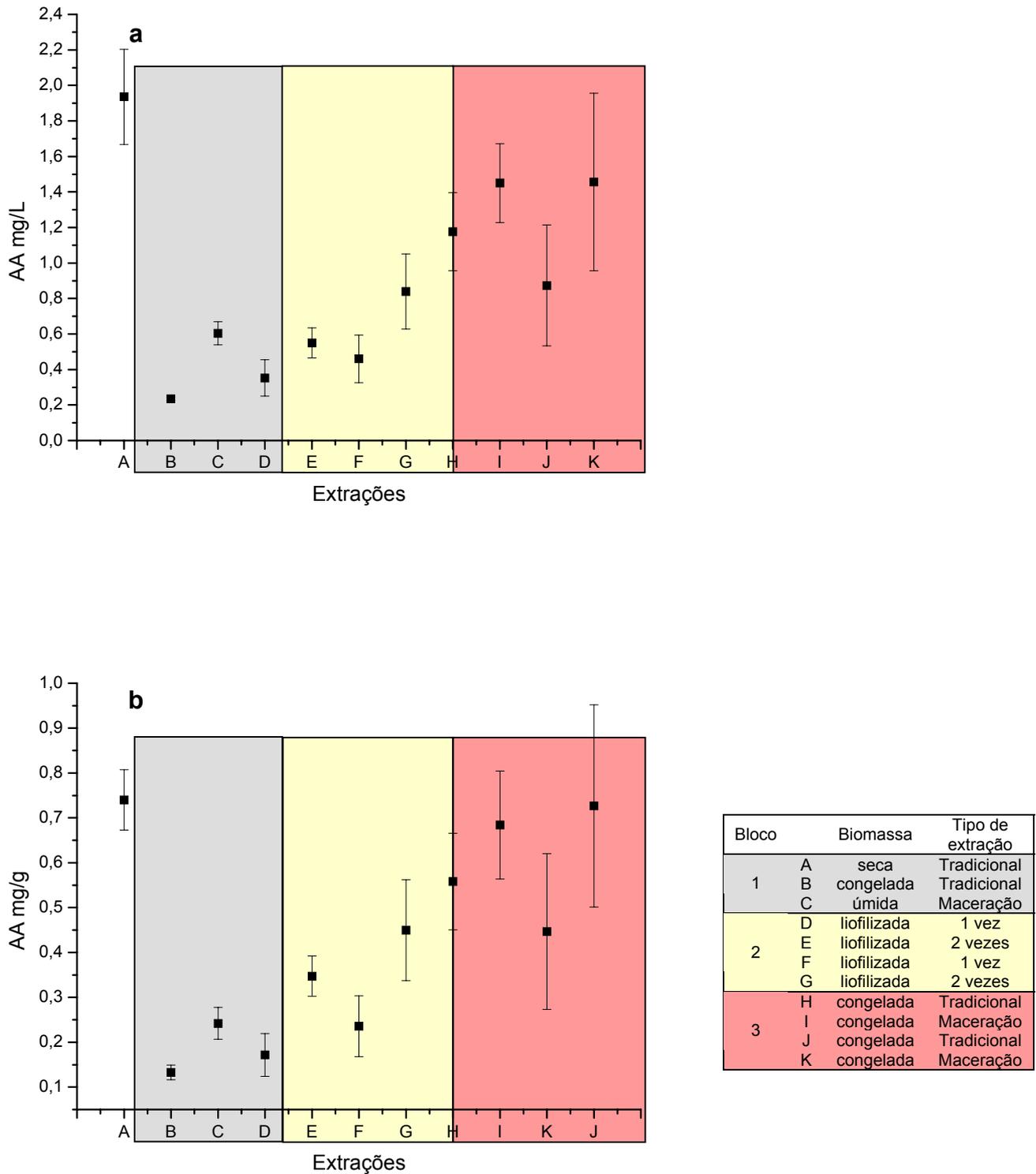


Figura 7. Valores médios (■) das concentrações (n=3-6) e desvio padrão de ácido araquidônico no meio de cultura (AA mg/L) (a) e a quantidade desse ácido graxos em relação ao peso seco da biomassa (AA mg/g) (b) de *Mucor* sp. (Linhagen M131) confrontando várias modificações da técnica de extração de lipídeos originalmente proposta por Ruegger (2001). A biomassa foi crescida em erlemeyers de 125mL e de 250mL com respectivamente 50mL (A,D,E,H,I) e 100mL (B,C,F,G,J,K) de solução aquosa de extrato de malte a 2%, sob agitação durante 6 dias a 25°C.

O segundo experimento possibilitou a comparação da extração dos ácidos graxos da biomassa liofilizada, quando se usou uma vez a solução extratora com aquela na qual esta foi utilizada duas vezes. Os maiores valores médios das porcentagens de lipídeos totais (Figura 8) e das concentrações AGL e AA, tanto no meio de cultura ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), como a quantidade destes ácidos na biomassa seca ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) foi obtida utilizando-se modificação da técnica original, na qual a biomassa foi tratada duas vezes pela solução de solventes. Outra vantagem da modificação proposta, em que se utiliza o liofilizador, é que se obtêm o peso seco real da amostra a ser analisada, evitando-se assim extrapolações do peso da biomassa ao se utilizar fatores de correção (Figura 8).

O terceiro experimento comparou a extração da biomassa (congelada) proposta por Ruegger (2001) com a modificação na qual a biomassa congelada foi macerada juntamente com a solução extratora. Aqui também os maiores valores médios tanto da concentração de AGL e de AA no meio de cultura ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), como os da quantidade deste ácido na biomassa seca ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) foram obtidos com a modificação onde a biomassa foi macerada, juntamente com a solução extratora, em relação a técnica original.

As modificações propostas da técnica original que utilizaram: a biomassa seca, sua fragmentação por maceração e a extração dos ácidos graxos desta utilizando-se a solução extratora por mais de uma vez, possibilitaram maior extração de AGL da biomassa fúngica do que a técnica original. Na literatura, cita-se que na indústria vem sendo utilizada a fragmentação do material biológico no processo de extração, para se obter maior rendimento das suas substâncias constituintes (GUNSTONE, 1996).

O problema enfrentado com a maceração consistiu na dificuldade de separação das fases dos solventes, o isolamento do óleo dissolvido nos solventes da biomassa fragmentada e o maior número de passos do experimento, podendo levar a perda de material. Esse fenômeno ocorre pois o óleo pode ficar muito aderido aos fragmentos do micélio dificultando sua recuperação, e também pode ser ainda degradado por lipases do próprio fungo, se estas não forem inativadas antes de serem liberadas das células rompidas. Sönnichsen e Müller, (1999) citaram que para amostras pequenas, a metodologia de extração que utiliza vários passos poderia implicar em perdas consideráveis do material a ser analisado. O maior problema está em prevenir a lipólise e a degradação autoxidativa que ocorre no processo (CERTIK; SHIMIZU, 1999).

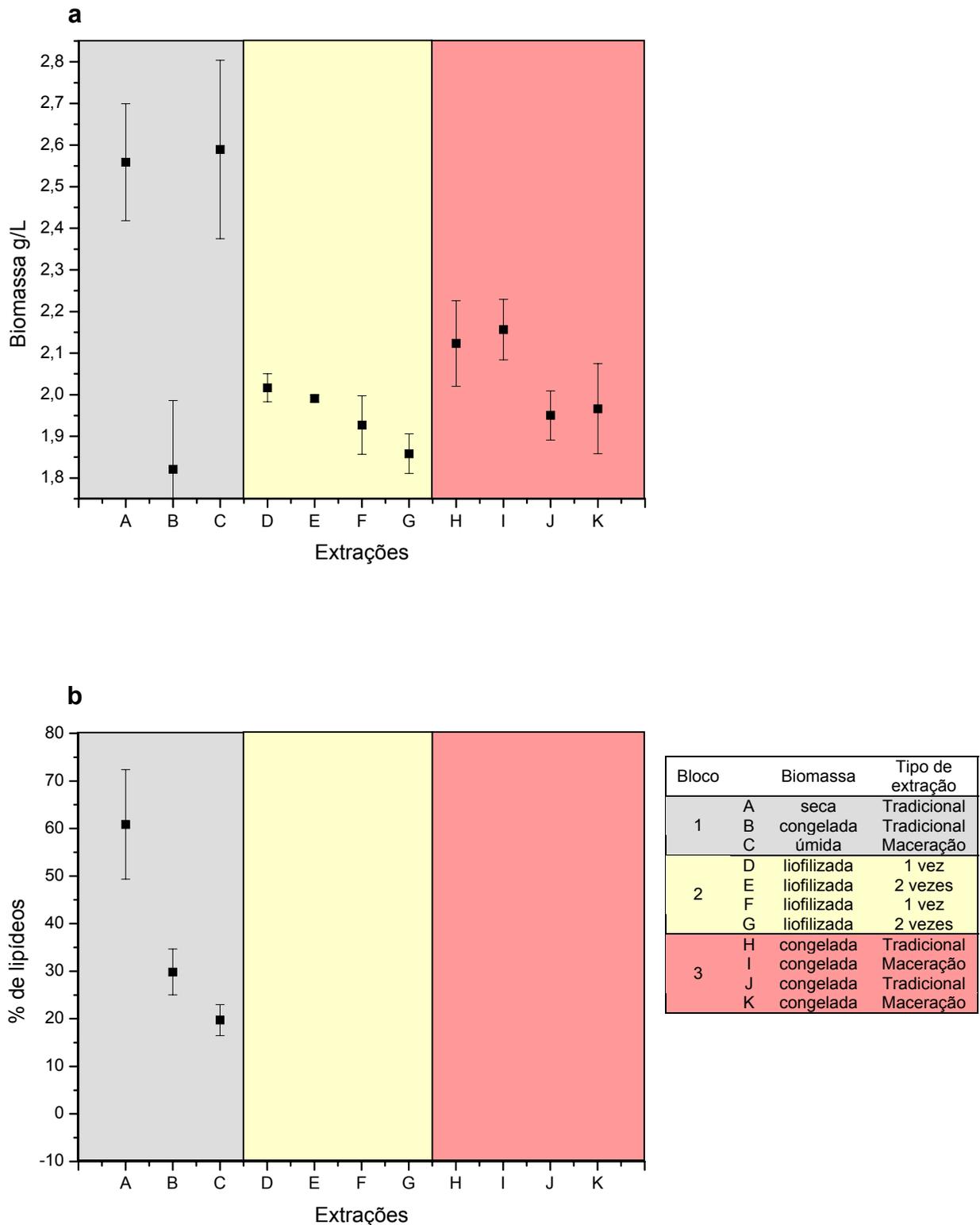


Figura 8. Valores médios (■) das concentrações (n=6-8) e desvio padrão da biomassa seca em relação as quantidades de meio de cultura (g/L) (a) e a quantidade de lipídeos totais (%) em relação ao peso seco da biomassa linhagens (b) de *Mucor* spp. isoladas no cerrado de Corumbataí, em cultivos realizados em erlemeyers de 125mL e de 250mL com respectivamente 50mL (A,D,E,H,I) e 100mL (B,C,F,G,J,K) de solução aquosa de extrato de malte a 2%, sob agitação durante 6 dias a 25°C.

As quantidades AA (Figura 7) obtidas nos pré-experimentos foram inferiores àquelas encontradas para o AGL. O maior valor médio de AA no primeiro pré-experimento foi de $0,74\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ em relação a biomassa seca, obtida a partir de cultivos em erlenmeyeres de 125mL utilizando-se a biomassa seca. A menor quantidade média de AA registrada nos pré-experimentos foi de $0,11\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ obtida em biomassas, obtidas a partir de cultivos em erlenmeyeres de 125mL e extraídas somente uma vez com a solução extratora.

A maior porcentagem de óleo total em relação o peso seco da biomassa, correspondente a 60%, foi encontrada na técnica de extração que utilizou a biomassa seca crescida nos erlenmeyeres de 125mL (Figura 8). A alta quantidade de óleo, talvez se justifique pela técnica empregada utilizar dessecador com sílica gel para se secar a biomassa que não foi congelada nem inativada. Portanto, o micélio ativo mas desprovido de nutrientes exógenos poderia estar acumulando lipídeos graças a autólise, permitida também pelo longo tempo de secagem necessário ao processo (aproximadamente 24h). Decidiu-se por não secar a biomassa em estufa para não haver perdas dos ácidos graxos estudados. Certik e Shimizu (1999) citaram que o uso de altas temperaturas e a destilação deve ser evitado, pois no óleo ocorre migração de duplas pontes, estereomutação, ciclização e dimerização.

Shimizu et al. (1989) também notaram que houve um aumento de lipídeos no micélio quando este foi separado do meio de cultura, exemplo do conteúdo de AA que chegou a 67,4% da fração lipídica. Bajpai et al. (1991) relataram que algumas linhagens de *Mortierella alpina* não produziram AA em temperaturas de 25°C , mas mostraram algum rendimento em temperaturas baixas e quando a biomassa foi estocada a 22°C por 1 semana o conteúdo de AA aumentou significativamente. Estes autores encontraram um aumento de AA de 5,7 para 8,7% em relação a biomassa seca e de 43,3 para 65,9% deste ácido graxo na fração lipídica em meio de cultura de glicose a 2%, e um aumento de 8,3 para 13,5% de AA em relação ao peso seco do fungo e de 25,3 para 41,3% da fração lipídica em meio de cultura de glicose a 5%. Kavadia et al. (2001) também observaram que os lipídeos se acumulavam depois que a fonte de nitrogênio foi exaurida. Mas, quando se limitou o carbono, o conteúdo lipídico decresceu. Presumivelmente, os lipídeos foram utilizados como fonte de carbono para o crescimento subsequente do fungo. O conteúdo de AGL que foi baixo durante toda a acumulação lipídica aumentou quando os lipídeos foram degradados.

O segundo maior valor médio da porcentagem de óleo com relação a biomassa foi o da técnica em que o material foi liofilizado e extraído duas vezes pela solução extratora. Quando somente o segundo experimento é analisado, ao se comparem as médias das biomassas extraídas uma vez com as médias das biomassas extraídas duas vezes pela solução extratora,

pode-se observar claramente um aumento considerável de mais que o dobro para as médias dos lipídeos encontrados nas biomassas crescidas nos erlenmeyeres de 125mL, e quase o dobro para as médias dos lipídeos extraídos das biomassas crescidas em erlenmeyeres de 250mL, tanto na porcentagem de óleo total, como na quantidade dos lipídeos estudados, com o emprego da modificação proposta de utilizar duas vezes a solução (Tabela 2, Figura 8).

Os maiores resultados foram observados nas biomassas que cresceram nos erlenmeyeres menores (125mL) levantando à hipótese de que o oxigênio esteja atuando sobre a concentração de AA e AGL do fungo. Os ácidos graxos poliinsaturados são formados pela elongação e dessaturação de uma fonte de carbono dentro do micélio. A dessaturação envolve reações aeróbicas portanto o oxigênio dissolvido no meio é um importante fator para a produção de ácidos graxos poliinsaturados (HIGASHIYAMA et al., 2002).

A biomassa, o conteúdo de óleo e o conteúdo de ácidos graxos no óleo são parâmetros importantes para o desenvolvimento de qualquer tecnologia (SOMASHEKAR et al., 2001). Entre outras estão: metodologias de extração, de otimização do processo, bioprospecção de novas linhagens produtoras, bem como o próprio uso do óleo puro ou em algum fármaco ou alimento. Idealmente, todos esses parâmetros deveriam ser muito altos para se alcançar a composição desejada de lipídeos. Mas dificilmente na prática é possível ter os três parâmetros altos ao mesmo tempo. Ratledge (1992) reportou que *Mucor circinelloides* produz óleo rico em AGL, quando o conteúdo de lipídeos é baixo. Somashekar et al. (2001) também evidenciaram que a quantidade de AGL na biomassa foi alta quando o rendimento de lipídeos de *M. hiemalis* foi baixo. Embora vários fungos filamentosos da classe dos Zigomicetos acumulem grandes quantidades de óleo, estes tendem a possuir uma concentração baixa de AGL, contrariamente, aqueles com altas concentrações de AGL possuem níveis baixos de óleo (CERTIK; SHIMIZU, 1999).

Os valores encontrados no experimento foram, em alguns casos, maiores do que os encontrados em outros experimentos na literatura citada. Por exemplo Lindberg e Hanson (1991) estudando a produção de AGL por *Mucor rouxii* crescido em erlenmeyeres de 300mL com 130mL e em fermentadores (2,3L) com diferentes meios líquidos compostos de fontes alternativas de nitrogênio e carbono, encontraram melhor resultado ($14\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Kennedy et al. (1993) analisando as características da produção de AGL por *Mucor hiemalis* e *Mucor circinelloides* crescidos durante 6 dias, em erlenmeyeres de 500mL com 150mL de meio de cultura com diferentes composições, verificaram valor máximo de produção de $4,7\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Roux et al. (1994) estudando a produção de AGL por várias espécies de *Mucor* crescidas durante 5 dias, sob agitação em erlenmeyeres de 1L, com 200mL de meio de cultura com

vários nutrientes e glicose como fonte de carbono, encontraram melhor resultado ($38,3\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco da biomassa de *Mucor circinelloides*), usando a técnica de extração na qual a biomassa foi liofilizada e depois submetida por duas vezes com solução de clorofórmio/metanol (2:1). Em tanques de 14L com ácido acético como fonte de carbono, Du Prezz et al. (1995, 1997) cultivaram *Mucor circinelloides*, encontrando maiores concentrações de AGL de $39,8\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomassa e de $340,0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ em meio de cultura. Três espécies selecionadas de *Mucor* foram cultivadas em reatores contendo resíduos industriais por Du Prezz et al. (1996) para a produção de AGL, sendo o melhor resultado obtido de $33\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomassa. Immelman et al. (1997) cultivaram *Mucor circinelloides* usando ácido acético como substrato e estudando razões diferentes de carbono e nitrogênio encontraram valores de AGL entre 13 a $38,6\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomassa. Ruegger (2001) estudando a atividade enzimática e produção de ácido γ -linolênico por fungos filamentosos isolados do solo, da estação ecológica de Juréia-Itatins, SP encontrou os maiores valores para o ácido estudado de $84,40\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de meio de cultura contendo glicose como fonte de carbono e $11,21\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomassa seca usando sacarose como fonte de carbono.

5.5. Produção de ácidos graxos pelas linhagens de *Mucor* spp.

Para se comparar as quantidades de lipídeos produzidas pelas diferentes linhagens de *Mucor* spp. foi adotada a modificação proposta em que se liofilizou as biomassas, pois esta permitiu calcular exatamente o peso de cada biomassa contida nos tubos, evitando-se extrapolações, aproximações, e utilização de fatores de correção. Essa técnica também promove a ruptura das células, facilitando a extração dos ácidos graxos constituintes pela solução extratora sem precisar macerar a biomassa. O processo de liofilização ainda inativa as enzimas dos fungos que poderiam estar degradando ou modificando os ácidos graxos.

De acordo com a literatura, as espécies mais adequadas a utilização industrial para a produção de ácidos graxos, devido ao alto rendimento e baixo custo dos substratos, parecem ser as da ordem Mucorales (EMELYANOVA 1997; WEETE et al. 1998; CERTIK; SHIMIZU, 1999; DYAL; NARINE, 2005). Por esse motivo se comparou somente a produção dos fungos isolados pertencentes a ordem Mucorales.

As linhagens de *Mucor* spp. comparadas foram as de números M1, M5, M59, M123, M131, M132, M133, M134, M230, M260, e MX. Continuou-se a utilizar o meio de cultura de malte a 2% nas comparações por este apresentar resultados satisfatórios e pela sua praticidade de preparação, mesmo sabendo que a relação ótima de C/N como as suas diferentes fontes e

concentrações variam muito entre os fungos, e que não se pode generalizar ou extrapolar as condições ótimas de uma linhagem para outra mesmo esta pertencente a mesma espécie (DYAL; NARINE, 2005). Optou-se pela utilização de um só meio de cultura complexo para o *screening*, pois dificilmente se conseguiria formular um meio ótimo que atendesse a todas as necessidades nutricionais de todas as linhagens envolvidas, respeitando-se as particularidades de cada uma. Para o acúmulo de óleo, o microrganismo precisa crescer em meio com excesso de carboidratos e quantidade limitante de nitrogênio. Deste modo o microrganismo na fase de crescimento exaure rapidamente o suprimento de nitrogênio, mas continua a assimilar a fonte de carboidrato, que é transportado diretamente para a síntese lipídica, resultando no acúmulo de triacilglicerois na forma de pequenas gotículas de óleo no interior das células, que podem chegar a corresponder até 70% da biomassa (RATLEDGE, 2004).

De acordo com os dados foi observado que a linhagem MX produziu maior quantidade de AGL em relação as outras linhagens testadas (Tabela 3, Figura 9).

Tabela 3. Valores das concentrações médias (n = 6-8) de ácido γ -linolênico (AGL $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e ácido araquidônico (AA $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) no meio de cultura, quantidades desses ácidos graxos ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) e a quantidade de lipídeos totais (%) em relação ao peso seco da biomassa de linhagens de *Mucor* spp. ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) isoladas no cerrado de Corumbataí.

Erlenmeyeres	Número da linhagem de <i>Mucor</i> spp.	AGL $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	AGL $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	AA $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	AA $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	% de óleo
250mL	131	17,13	11,82	n.d	n.d	7,09
	132	26,71	10,79	0,26	0,11	11,55
	134	12,50	7,21	0,11	0,06	7,10
	260	15,51	6,91	0,12	0,05	8,79
	X	61,99	12,68	n.d.	n.d.	7,98
125mL	1	15,14	8,40	n.d.	n.d.	10,65
	5	28,57	10,09	n.d.	n.d.	11,92
	59	14,50	8,05	0,24	0,13	17,98
	123	6,02	3,34	n.d.	n.d.	20,16
	131	14,29	20,32	0,28	0,30	11,12
	132	32,40	12,32	0,30	0,13	13,80
	133	19,94	6,53	n.d.	n.d.	19,80
	134	8,02	4,30	n.d.	n.d.	9,52
	230	31,39	13,43	0,33	0,14	5,48
	260	27,08	11,84	0,18	0,08	9,10
	X	55,70	24,53	n.d.	n.d.	9,83
125mL*	131	201,62	28,74	3,12	0,45	51,70
	132	90,45	13,41	0,94	0,14	23,60
	X	26,78	5,82	0,59	0,13	35,71

Cultivos realizados em erlenmeyeres de 125mL e de 250mL com respectivamente 50mL e 100mL de solução aquosa de extrato de malte a 2%, alguns com suplementação de óleo de girassol a 2% (*), a 26°C, durante 6 dias, sob agitação. (n.d. = não determinado)

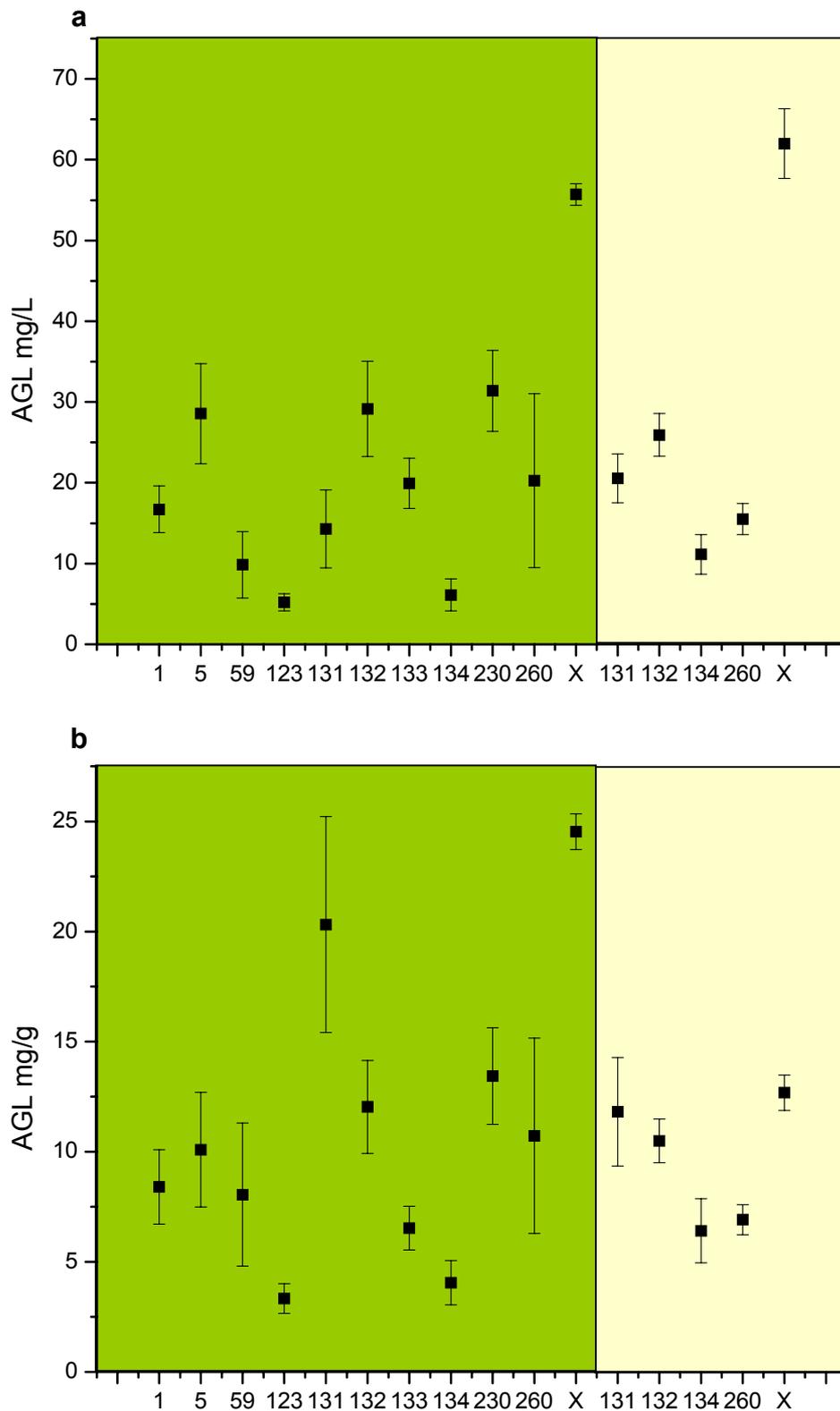


Figura 9. Valores médios (n = 6-8) (■) das concentrações e desvio padrão de ácido γ -linolênico no meio de cultura (AGL mg/L) (a), e quantidades desse ácido graxo em relação ao peso seco da biomassa (AGL mg/g) (b) de linhagens de *Mucor* spp. isoladas no cerrado de Corumbataí, em cultivos realizados em erlemeyers de 125mL (■) e de 250mL (□) com respectivamente 50mL e 100mL de solução aquosa de extrato de malte a 2%, sob agitação durante 6 dias a 25°C.

A linhagem MX produziu maiores teores de AGL tanto em relação a miligramas desse ácido graxo por litro de meio de cultura (médias de $61,9\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e de $55,7\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente em frascos de 250mL e 125mL), como em relação a miligramas por grama de biomassa seca (médias de $12,68\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ e de $24,63\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente em frascos de 250mL e 125mL). Foram constatadas que outras linhagens também produziram este ácido graxo, todavia, em quantidades menores de acordo com a seguinte ordem de grandeza em relação as médias desse ácido graxo em miligramas por grama de biomassa seca produzida em erlenmeyeres de 125mL: M131, M230, M132, M260, M5, M1, M59, M133, M134, M123 e M131, M132, M134, M260, para as biomassas crescidas em frascos de 250mL.

Em relação ao AA (Tabela 3, Figura 10) as melhores linhagens produtoras foram: M230 com média $0,33\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ em frasco de 125mL e a linhagem M132 com médias de $0,30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,26\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ em frascos de respectivamente de 125mL e 250mL, seguidas pelas linhagens M131, M59, M260, em ordem decrescente de produção deste mesmo ácido. Somente em uma repetição nos erlenmeyeres maiores detectou-se AA produzido pela linhagem M131 ($0,28\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e pela linhagem M260 ($0,18\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Algumas linhagens não produziram quantidades detectáveis desse ácido graxo. Além disso, os rendimentos quanto à produção destes dois ácidos graxos foram distintos quando os experimentos foram desenvolvidos em frascos erlenmeyeres de 125 e 250mL. Os resultados foram melhores em um ou outro volume dependendo da linhagem estudada. Como exemplo, as linhagens MX e M131 não produziram quantidades detectáveis de ácido araquidônico nos erlenmeyeres maiores. As linhagens MX, M1, M5, M123, M133, M134 não produziram quantidades detectáveis desse ácido nos erlenmeyeres menores. As relações entre o O_2 dissolvido e volume do meio de cultura poderiam justificar esses dados, pois são diferentes para os dois tamanhos de frascos utilizados, devido a área de troca gasosa ser diferente entre eles.

As melhores linhagens produtoras de biomassa (Figura 11) nos frascos erlenmeyeres de 125mL em ordem decrescente foram as linhagens: M133, M5, M132, M230, MX, M1, M260, M123, M134, M131.

Não foram realizados experimentos de extração para as linhagens M5, M59, M133 e M230 que cresceram em erlenmeyeres de 250mL devido a contaminação no final do experimento. Apesar de algumas delas apresentarem bons resultados em erlenmeyeres de 125mL a repetição dos experimentos novamente em frascos de 250mL foi impossibilitada pela contaminação das respectivas culturas mães.

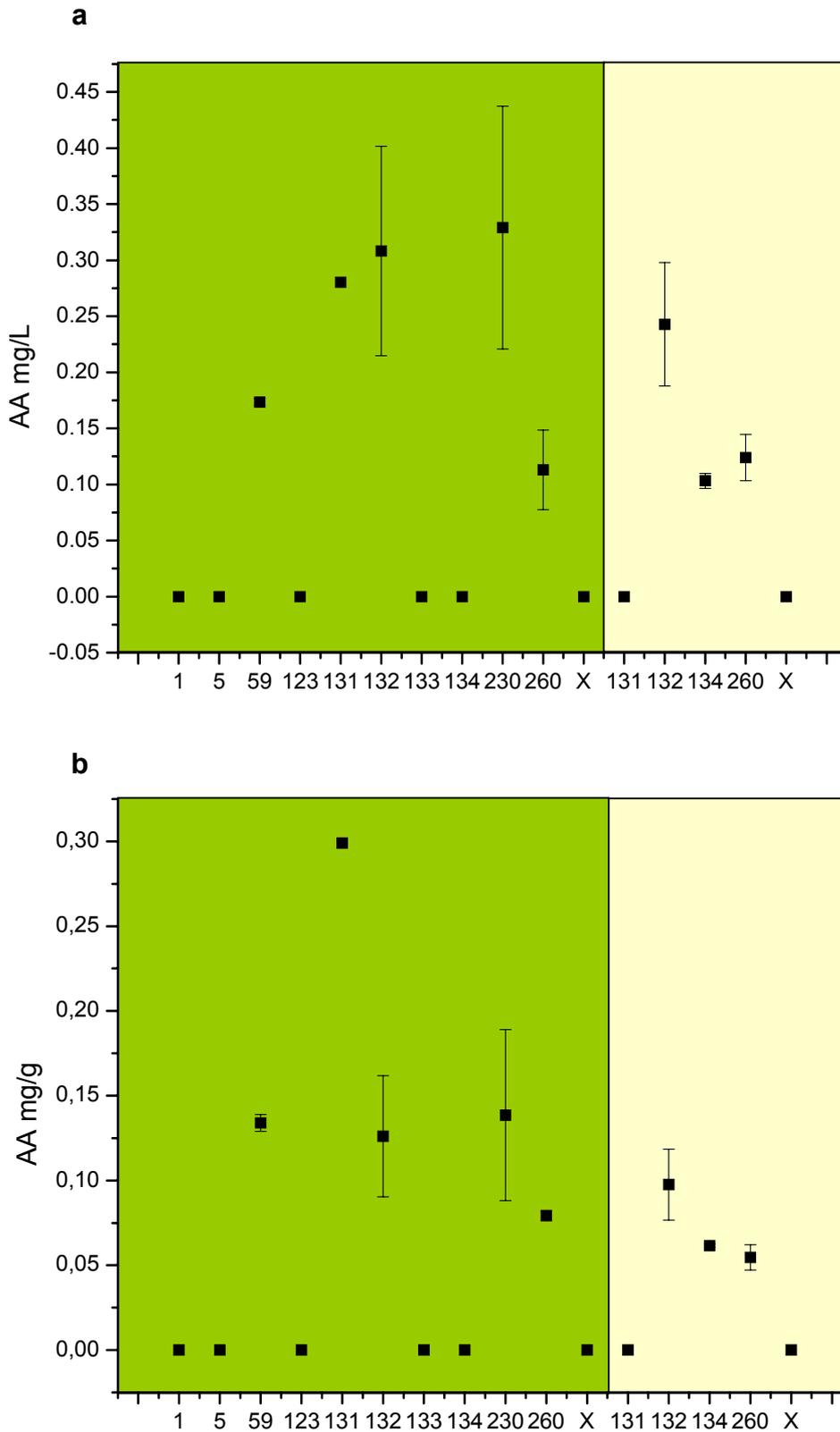


Figura 10. Valores médios ($n = 6-8$) (■) das concentrações e desvio padrão de ácido araquidônico no meio de cultura (AA mg/L) (a), e quantidades desse ácido graxo em relação ao peso seco da biomassa (AA mg/g) de linhagens de *Mucor* spp. isoladas no cerrado de Corumbataí, em cultivos realizados em erlemeyers de 125mL (■) e de 250mL (■) com respectivamente 50mL e 100mL de solução aquosa de extrato de malte a a 2%, sob agitação durante 6 dias a 25°C.

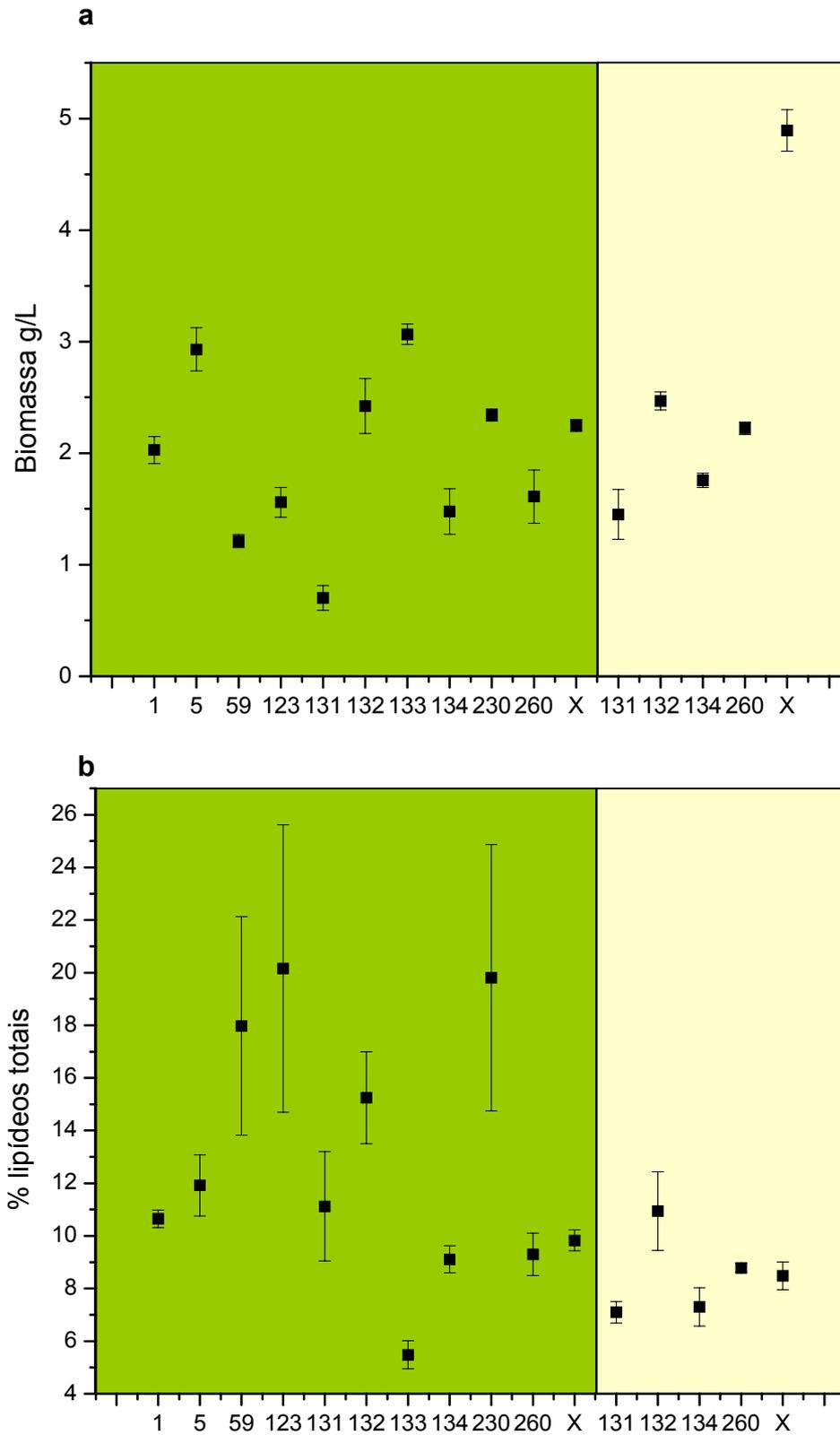


Figura 11. Valores médios (n=6-8) (■) das concentrações e desvio padrão da biomassa seca em relação as quantidades de meio de cultura (g/L) (a) e a quantidade de lipídeos totais (%) em relação ao peso seco da biomassa linhagens (b) de *Mucor* spp. isoladas no cerrado de Corumbataí, em cultivos realizados em erlemeyers de 125mL (■) e de 250mL (□) com respectivamente 50mL e 100mL de solução aquosa de extrato de malte a 2%, sob agitação durante 6 dias a 25°C.

As melhores linhagens produtoras de biomassa nos erlenmeyeres de 250mL foram em ordem decrescente: MX, M132, M260, M134, M131. As melhores linhagens produtoras de lipídeos totais (Figura 11), crescidas nos frascos erlenmeyeres de 125mL foram em ordem decrescente: M123, M230, M59, M132, M5, M131, M1, MX, M260, M134, M133. E as linhagens melhores produtoras crescidas nos frascos erlenmeyeres de 250mL foram em ordem decrescente: M132, M260, MX, M134, M131.

As linhagens MX, M131 e M132 foram também cultivadas em frascos de 125mL com 50mL meio líquido contendo 2% de óleo de girassol e 1% de extrato de levedura. As quantidades de AGL ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e de AA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) foram maiores nas biomassas produzidas no cultivo da linhagem M131, respectivamente 1.311,16% e 1.011,37% (Tabela3, Figura 12) em relação àquelas observadas a partir do cultivo deste microrganismo em meio de malte. Os valores destes mesmos ácidos encontrados no cultivo da linhagem M132 em meio suplementado com óleo de girassol foram 179,14% maiores quanto ao AGL e 170,79% para o AA, em relação aos valores obtidos em meio de malte. A linhagem MX apresentou diminuição de 51,93% na quantidade de AGL em relação ao meio ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e diminuição de 76,31% na quantidade de AGL em relação a biomassa seca ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$). A porcentagem de óleo em relação a biomassa seca (Figura 12) aumentou significativamente para as três linhagens estudadas. O maior aumento de lipídeos totais foi verificado nas biomassas da linhagem M131, com um aumento de 364,78% em relação aos valores encontrados nas biomassas crescidas no meio de malte sem suplementação de óleo de girassol. Os resultados encontrados nos dois meios de cultura quanto aos AGL e AA demonstraram que a adição de óleo vegetal no meio de cultura pode otimizar ou mesmo inibir produção dos ácidos graxos estudados dependendo da linhagem. Outros testes são necessários para se evidenciar se a suplementação com óleo de fato otimiza a produção dos ácidos graxos estudados. Pois, embora Kendrik e Ratledge (1996) tenham reportado que o óleo extracelular no meio causa repressão da dessaturação e alongação de ácidos graxos em fungos filamentosos, existem vários relatos de que certos ácidos graxos podem servir de substratos ou precursores para a produção de novos ácidos graxos de interesse comercial (SHIMIZU et al., 1989; AGGELIS et al., 1991; SHINMEN et al., 1989; CERTIK et al., 1997).

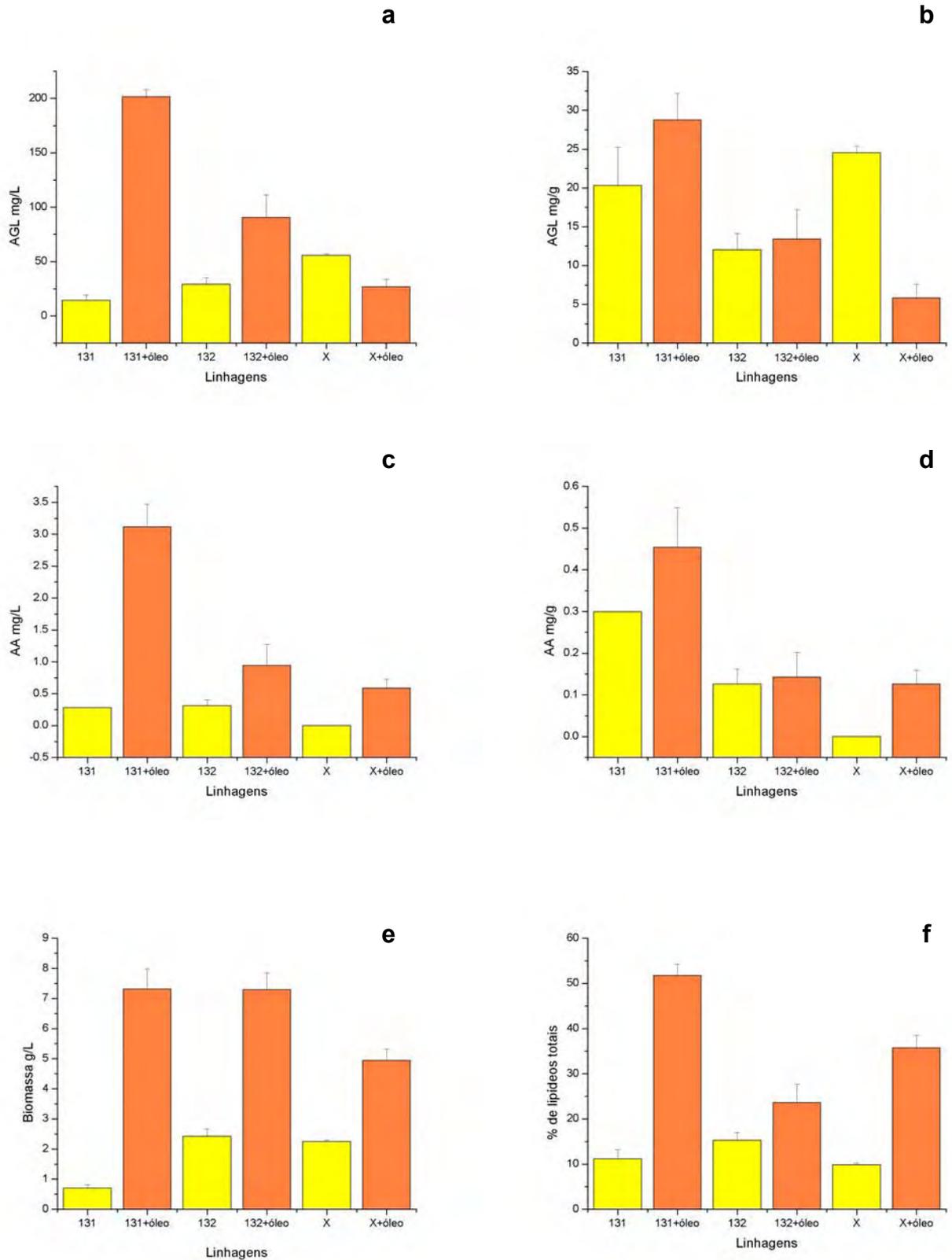


Figura 12. Valores médios ($n = 6-8$) das concentrações e desvio padrão de ácido γ -linolênico (AGL mg/L) (a) e ácido araquidônico (AA mg/L) (c) no meio de cultura, quantidades desses ácidos graxos (mg/g) (c, d) e a quantidade de lipídeos totais (%) em relação ao peso seco da biomassa (f), e a concentração desta em relação ao meio de cultura (e) de linhagens de *Mucor* spp. (M131, M132, MX) isoladas no cerrado de corumbataí, em cultivos realizados em erlemeyers de 125mL com 50mL de solução aquosa de extrato de malte a 2%, com (■) ou sem (□) suplementação de óleo de girassol a 2%, sob agitação durante 6 dias a 25-26°C.

O aumento de lipídeos na biomassa parece não ter sido resultado da absorção ou adsorção do óleo pelo fungo, pois teve-se o cuidado de lavar a biomassa várias vezes. Algumas amostras nos experimentos foram observadas ao microscópio e mostraram-se isentas de óleo aderido a sua superfície. Jeffery et al. (1997) em um ensaio de crescimento de *Mucor circinelloides* f. *circinelloides* sobre óleo de girassol também relatou que nas observações ao microscópio as hifas lavadas pareciam estar “limpas” ou seja isentas de óleo aderido a sua superfície.

É sabido que os óleos comestíveis são excelentes fontes de carbono para o crescimento microbiano, utilizados como substratos, ou como suplemento desse, possuindo aproximadamente o dobro do valor energético da glicose. Quando microrganismos são cultivados em gorduras animais ou vegetais eles podem alterar o perfil dos óleos produzidos. (KORITALA et al., 1987; RATLEDGE, 1991; AGGELIS; SOURDIS, 1997; PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2003). Foi demonstrado que a utilização de óleo de girassol aumenta significativamente a biomassa e a quantidade de ácido γ -linolênico (JEFFERY et al., 1999).

Schimizu et al. (1989) observaram um aumento da biomassa e do seu conteúdo de AA com a suplementação de óleo. Shinmen et al. (1989) testaram várias suplementações ao meio, incluindo n-alcanos e óleos naturais. Os resultados mostraram que a produção de AA aumentou 2,8 vezes com a suplementação de óleo de soja, quando comparado ao meio sem este suplemento. Bajpai et al. (1991) encontraram ainda um decréscimo na produção de AA por *Mortierella alpina* em meio com suplementação com óleo de linhaça. Kendrik e Ratledge (1996) encontraram quase o dobro de lipídeos totais em fungos cultivados com suplementação de óleo frente aos que foram somente cultivados em meio com glicose. Funtikova e Mysyakina (1997) adicionaram ácidos graxos livres no meio líquido e observaram um aumento na produção de AGL e AA por *Mortierella spinosa*. Certik et al. (1997) demonstraram que *Cunninghamella echinulata* produziu $373\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido γ -linolênico em meio contendo óleo de girassol e glicose sob condições ótimas de cultivo. Eles relataram que a natureza do óleo desempenha um papel importante na sua utilização pelos microrganismos. O uso de óleos ricos em ácido linolênico, que consiste em torno de 70% do óleo de girassol, estimularia a síntese de AGL.

5.6. Produção de lipídeos pelas linhagens de *Mucor* spp. cultivadas em biorreator

No estudo realizado em biorreator os fungos mostraram um bom desenvolvimento após 24h de crescimento. No biorreator com meio de cultura de extrato de malte a 2% sem a adição de óleo a linhagem melhor produtora de AGL (Tabela 4, Figura 13) foi a MX em relação a quantidade de ácido por litro de meio de cultura ($84,89\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), seguida pela linhagem M131 ($56,55\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Em relação a quantidade desse ácido graxo pela biomassa seca a linhagem melhor produtora foi a M131 ($30,60\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$), seguida pela linhagem MX ($27,63\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$).

A linhagem M131 foi a melhor produtora de AA ($2,13\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $1,15\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) e a melhor produtora de lipídeos totais, sendo sua biomassa formada por 40,57% destes. Seguida pela linhagem MX com $0,14\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,04\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de AA e com 16,97% de sua biomassa na forma de lipídeos.

Tabela 4. Valores das concentrações médias (n=6) de ácido γ -linolênico (AGL $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e ácido araquidônico (AA $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) no meio de cultura, quantidades desses ácidos graxos ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) e a quantidade de lipídeos totais (%) em relação ao peso seco da biomassa de três linhagens de *Mucor* spp. isoladas no cerrado de Corumbataí.

Número da linhagem de <i>Mucor</i> spp.	Meio de cultura	AGL $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	AGL $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	AA $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	AA $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	% de óleo
131	Malte	56,55	30,60	2,13	1,15	40,57
132		5,23	1,64	0,02	0,01	1,32
X		84,89	27,64	0,14	0,04	16,97
131	Malte com	76,35	40,77	0,78	0,42	17,71
132	Óleo	26,17	7,24	0,38	0,10	2,72
X		3,47	1,23	0,00	0,00	63,32

As biomassas foram crescidas em Biorreator contendo 1L de solução aquosa de extrato de malte a 2% com ou sem acréscimo de óleo de girassol a 2%, sob agitação de 132rpm, fluxo de ar a 2V_{vm} e a 26°C.

Na suplementação com óleo de girassol no ensaio com o biorreator não se adicionou extrato de levedura como se fez no ensaio em erlenmeyer para se tentar otimizar a produção de ácidos graxos, pois sabidamente o acúmulo de lipídeos em fungos filamentosos é disparado pela exaustão de nitrogênio no meio de cultura, que ainda tem alguma fonte de carbono na forma de açúcar a ser assimilado, prevenindo a proliferação celular e permitindo o acúmulo de lipídeos dentro da célula (KENDRIK; RATLEDGE, 1990; RATLEDGE, 2002; 2004).

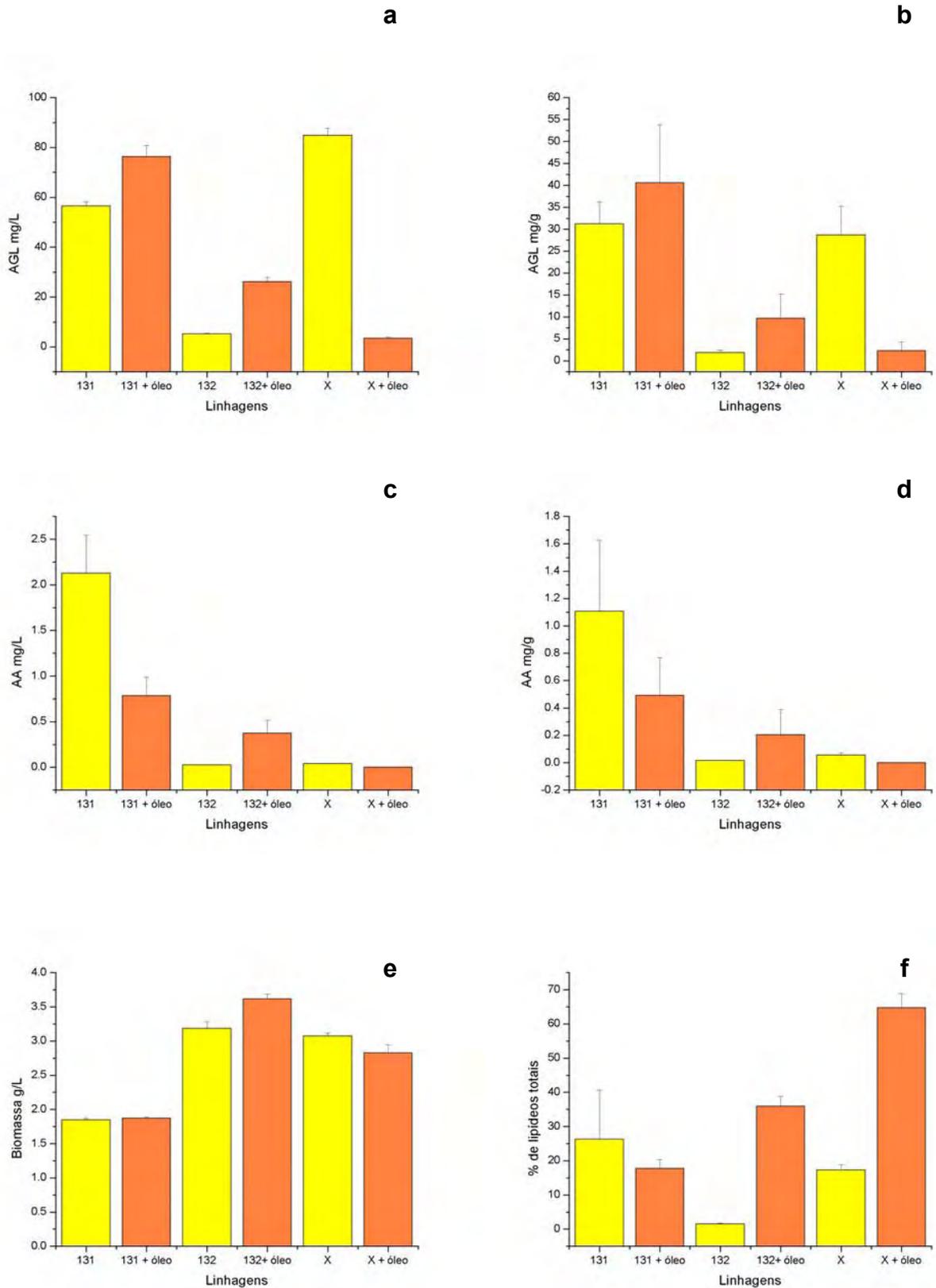


Figura 13. Valores médios ($n = 6-8$) (■) das concentrações e desvio padrão de ácido γ -linolênico (AGL mg/L) (a) e ácido araquidônico (AA mg/L) (c) no meio de cultura, quantidades desses ácidos graxos (mg/g) (c, d) e a quantidade de lipídeos totais (%) em relação ao peso seco da biomassa (f), e a concentração desta em relação ao meio de cultura (e) de linhagens de *Mucor* spp. (M131, M132, MX) isoladas no cerrado de corumbataí, em cultivos realizados em Fermentador contendo 1L de solução aquosa de extrato de malte a 2% com (■) ou sem (□) acréscimo de óleo de girassol a 2%, sob agitação e fluxo de ar com 2v.v.m. durante 6 dias a 26°C.

Com a suplementação de óleo de girassol a 2% no meio de cultura, a linhagem melhor produtora dos ácidos graxos estudados foi a M131, tanto em relação a quantidade de AGL ($76,35\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $40,77\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) como de AA ($0,78\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,41\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$). Mas o conteúdo de lipídeos totais na biomassa diminuiu em 56,35%, em relação ao cultivo sem a suplementação de óleo, sendo sua biomassa constituída de somente 17,71% de lipídeos.

A linhagem M131, com acréscimo de óleo, se concentrou no fundo do biorreator, enquanto que sem a suplementação de óleo o fungo cresceu disperso por todo o meio de cultura contido no frasco do biorreator. Esta linhagem teve um aumento de 35% na concentração de AGL por litro de meio de cultura, e um aumento de 33,26% na quantidade deste ácido em relação a biomassa seca. Já a concentração de AA bem como sua quantidade em relação a biomassa seca diminuiu em torno de 63%, com a adição do óleo de girassol no meio de cultura.

A linhagem M132 foi a que mostrou os melhores resultados adicionado-se o óleo de girassol, com um aumento de 400% na concentração de AGL em relação ao meio de cultura e 340% na quantidade desse ácido graxo em relação a biomassa seca. Mais pronunciado ainda foi o aumento de 1345% na concentração de AA, em relação ao meio de cultura, e de 1172% em relação ao peso seco da biomassa. A quantidade de lipídeos totais na biomassa foi a mais baixa encontrada nas três linhagens, em torno de 2,72% do peso da biomassa seca, mas com a suplementação de óleo aumentou em 106,95%.

No ensaio em biorreator com a linhagem MX, a adição de óleo de girassol não foi interessante para a produção dos ácidos graxos estudados, pois a concentração de AGL no meio de cultura e a quantidade deste, em relação a biomassa seca, sofreram uma diminuição de 96% bem como os valores para o AA, que sofreram uma diminuição de 100% quando comparados com os valores desses ácidos graxos encontrados na biomassa crescida somente no meio de malte. Já, a quantidade de lipídeos totais aumentou em 273,13% com a adição de óleo no meio de cultura, correspondendo a 63,32% da biomassa seca. Esta linhagem parece também ter sofrido alterações na sua morfologia quando crescida no biorreator. Totani et al. (1992) estudando a produção de AA por *Mortierella* sp. relataram, que vários parâmetros como velocidade de agitação, aeração, temperatura, concentração de substrato assimilável, tempo de fermentação, afetavam a morfologia deste fungo diferentemente quando crescido em frascos sob agitação e em biorreatores de 4L.

A influência sobre as três linhagens, da suplementação de óleo de girassol, utilizando-se o biorreator foi parecida ao nível de se otimizar ou não a produção dos ácidos graxos estudados bem como as quantidades de lipídeos totais, em relação aos ensaios realizados nos

frascos erlenmeyeres sob agitação orbital. Em um estudo de aumento de escala para produção de AGL, Kennedy et al. (1994) demonstraram que o desempenho biológico foi o mesmo em biorreatores de 10L e nos frascos dispostos em mesa agitadora, com somente algumas pequenas diferenças que podem ser atribuídas ao aumento de escala.

Os resultados demonstraram uma tendência em que os fungos que acumulam grandes quantidades de óleo, tendem a possuir uma concentração baixa de AGL. Contrariamente aqueles com altas concentrações de AGL, possuem níveis baixos de óleo corroborando esses resultados com os encontrados na literatura (RATLEDGE, 1992; CERTIK; SHIMIZU, 1999; SOMASHEKAR et al., 2001).

Os baixos valores de AA encontrados no presente estudo podem ser justificados por alguns fatores. As linhagens escolhidas podem ser pobres produtoras desse ácido graxo. O processo de extração pode não se ter recuperado todo o ácido graxo produzido por este ser muito instável. O ácido araquidônico é formado em temperaturas mais baixas (ZHU et al., 2006), havendo dificuldades metodológicas para se alcançar temperaturas baixas nos experimentos realizados não se pode testar essa hipótese. As amostras foram extraídas em seguida a sua liofilização, após seis dias de crescimento, considerado o ótimo para esses fungos. Talvez a quantidade de carbono no substrato tenha sido elevada, e a biomassa deveria ter sido coletada com mais dias de crescimento, pois não se conseguiu exaurir o meio totalmente. Conforme Bajpai et al. (1991) o ácido araquidônico, pode se formar em micélios mais velhos e nos extratos de fungos que são armazenados em temperaturas baixas. Em um experimento conduzido para obtenção de AA em meio com excesso de carbono o rendimento do conteúdo total de lipídeos melhorou, enquanto que os valores de AA permaneceram estáticos (HIGASHIYAMA et al., 2002).

A adição de óleo de girassol afetou diferentemente a produção de AA entre as linhagens estudadas, e também afetou diferentemente a produção em relação aos ensaios feitos em erlenmeyeres, quando comparados aos feitos em biorreator. Alguns estudos evidenciaram que a quantidade de AA aumenta com a suplementação de óleo vegetal (HIGASHIYAMA et al. 2002; DYAL; NARINE, 2005). Kennedy e Krouse (1999) comentam que não importa qual seja o experimento, a estratégia na maioria das vezes envolve um grande número de repetições. Este grande número de repetições necessita de frascos e mesa agitadora de movimento orbital, já que não é muito prático a utilização de um grande número de experimentos utilizando se biorreator. Mas o uso de erlenmeyeres ou frascos e mesa agitadora têm quatro problemas principais:

- o pH não é controlável durante a fermentação;
- a capacidade de troca de oxigênio nos frascos é pobre;
- pode ocorrer evaporação dentro dos frascos;
- e a mistura pode não ser adequada.

Ratledge (1992) testou 300 organismos para a produção de ácido γ -linolênico em frascos sob agitação e selecionou 80 destes para experimentos em biorreator de 1L, justamente pelas presumíveis limitações dos frascos. Kennedy e Krouse (1999) questionam se todas as variáveis poderiam ser aplicadas em maiores escalas para todos os tipos de sistemas, deixam claro a contribuição favorável dos ensaios em frascos a tal tipo de ação devido a sua simplicidade e a maior viabilidade de conduzir experimentos com um grande número de repetições.

6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para que as conclusões dos resultados obtidos em sistemas com frascos possam ser aplicadas para otimizar os meios de cultura e as condições de cultivo nos sistemas de biorreatores necessitam de mais estudos enfocando esse tipo de comparação. No presente trabalho demonstrou-se existir correlações entre os dois sistemas. Os dois sistemas de cultivo em diferentes escalas mostraram quais foram as linhagens melhores produtoras de: biomassa, óleo total e dos ácido graxos estudados, com ou sem a adição de óleo de girassol ao meio. Esta adição demonstrou afetar igualmente os fungos nos dois sistemas, aumentando ou não seu teor de lipídeos totais e dos ácidos graxos aqui estudados.

A biomassa, o conteúdo de óleo e o conteúdo de ácidos graxos no óleo são parâmetros importantes para o desenvolvimento de qualquer tecnologia. Entre outras estão: metodologias de extração, de otimização do processo, bioprospecção de novas linhagens produtoras, bem como o próprio uso do óleo puro ou em algum fármaco ou alimento. Idealmente todos esses parâmetros deveriam ter valores muito altos para se alcançar a composição desejada de lipídeos, mas dificilmente na prática é possível ter os três parâmetros altos ao mesmo tempo. O presente trabalho evidenciou esse fato demonstrando que nem sempre o melhor produtor de biomassa (linhagem M132) ou mesmo de óleo total (linhagem MX) é o melhor produtor de algum ácido graxo específico, no caso, os ácidos γ -linolênico e araquidônico (linhagem M131).

A produção microbiológica de lipídeos, que contêm ácidos graxos de interesse, objetiva e se concentra na seleção de organismos e otimização das condições de cultivo. Desafortunadamente, pouca atenção é dispensada no isolamento do óleo em si. A maioria dos métodos de extração aplicados para os sistemas microbianos foram originalmente descritos e propostos para tecidos animais e materiais de origem vegetal. A extração de lipídeos da biomassa é um passo importante na quantificação dos lipídeos dos microrganismos produtores e conseqüentemente na seleção dos mesmos. A quantidade de lipídeos totais depende da escolha do método de extração. A escolha do procedimento de isolamento depende da natureza das células fúngicas e do tipo de extrato desejado.

Métodos rápidos e eficientes de extração de lipídeos formam a base para otimização das condições de cultura e seleção de espécies para a produção de lipídeos em larga escala. Portanto, processos confiáveis de recuperação e purificação de óleos microbianos precisam ser desenvolvidos e aplicados para promover o desenvolvimento dessa área da biotecnologia de microrganismos.

O presente trabalho contribuiu nesse sentido pois as modificações propostas da técnica tradicional de extração de lipídeos se mostraram mais eficientes do que a mesma, na extração do óleo total e também dos ácidos graxos estudados.

7. REFERÊNCIAS

- AGGELIS, G.; BALATSOURAS, G.; COMAITIS, M.; ANAGNOTOPOULOU, G.; DIMITROULIAS, G.; PINA, M.; GRAILLE, J. Production d'acide gamma linoléique par bioconversion de l'acide linoléique de quelques huiles végétales. **Revue française des corps gras**, Paris, v.38, n.3/4, p.95-101, 1991.
- AGGELIS, G.; SOURDIS, S. J. Prediction of lipid accumulation-degradation in oleaginous microorganisms growing on vegetable oils. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v.72, p.159-165, 1997.
- AINSWORTH, S. **The Fungi: The Cell**. New York: Academic Press, 1965. v.1, 784p.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Micology**. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. 758p.
- ALMEIDA, C. L. F. de, OLIVEIRA, J. B. de, PRADO, H. Levantamento pedológico semidetalhado do Estado de São Paulo, Quadrícula de São Carlos, SP. Escala:1:100.000. **Boletim Técnico do Instituto Agrônômico**, Campinas, 1981. 40p.
- ATTILI, D. S. **Sucessão fúngica e decomposição da fração foliar da serapilheira de cerrado no Município de Corumbataí, SP**. 1989. 183f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Rio Claro, 1989.
- BAJPAI, P. K. BAJPAI, P. WARD, O. P. Arachidonic acid production by fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.4, p.1255-1258, 1991.
- BÄRLOCHER, F. The role of fungi in the nutrition of stream invertebrates. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.91, p.83-94, 1985.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, p.911-917, 1959.
- BRITO, M. C. W. de, **Cerrado: Bases para conservação e uso sustentável das áreas de cerrado do estado de São Paulo**. São Paulo: Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 1997. 184p. série PROBIO/SP.
- CAMARGO, P. N., ARENS, K. Observações sobre uma reserva de cerrado. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.42, n.1, p.3-9, 1967.
- CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D. A.; OLIVEIRA, J. G.; SCHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, São Paulo, v.26, n.1, p.75-80, 2003.
- CERTIK, M.; BALTÉSZOVÁ, L.; SAJBIDOR, J. Lipid formation and γ -linolenic acid production by Mucorales fungi grown on sunflower oil. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.25, p.101-105, 1997.

CERTIK, M.; SHIMIZU, S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. **Jornal of Bioscience and Bioengineering**, Amsterdam, v.87, n.1, p.1-14, 1999.

CESAR, C. PAGANO, S. N., LEITÃO FILHO, H. F., MONTEIRO, R., SILVA, O. A., MARINIS, G. Estrutura fitossociológica do estrato arbóreo de uma área de vegetação de cerrado no município de Corumbataí, SP (Estado de São Paulo). **Naturalia**, São Paulo, v.13, p.91-101, 1988.

CHRISTENSEN, M. A view of fungal ecology. **Mycologia**, Lancaster, v.81, n.1, p.1-19, 1989.

CHRISTIE, W. W. **Lipid Analysis**. 2.ed. Oxford: Pergamon Press, 1982. 207p.

CLARK, F.E. Agar-plate method for total microbial count. In: BLACK, C.A.; EVANS, D.; WHITE, J.L.; ENSMINGER, L.E.; CLARK, F.E.; DINAUER R.C. (Eds.). **Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties**. New York: Madson Inc., p.1460-1466, 1965

COSTA, S. M. G. **Efeito da adição de vinhaça na dinâmica da microflora do solo de cerrado de Corumbataí, SP.**, 1983. 130f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1983.

DIFCO MANUAL. **DIFCO MANUAL**. 9th ed. Michigan: Difco Laboratories, 1972. 350p.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of Soil Fungi**. New York: Academic Press, 1980. 2v. 560p.

DU PREEZ, J. C.; IMMELMAN, M.; KOCK J. L.; KILIAN, S. G. Production of gamma-linolenic acid by *Mucor circinelloides* and *Mucor rouxi* with acetic acid as carbon substrate, **Biotechnology Letters**. Dordrecht, v17, n.9, p.933-938. 1995.

DU PREEZ, J. C.; IMMELMAN, M.; KILIAN, S. G. The utilization of short-chain monocarboxylic acids as carbon sources for the production of gamma-linolenic acid by *Mucor* strains in fed-batch culture. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 12 p.68-72, 1996.

DU PREEZ, J. C., IMMELMAN, M. KOCK J. L. KILIAN, S. G. The effect of acetic acid concentration on the growth and production of gamma-linolenic acid by *Mucor circinelloides* CBS203.28 in fed-batch culture. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v.13, p.81-87, 1997.

DYAL, S. D.; NARINE, S. S. Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. **Food research international**, Oxford, v.38, n.4, p. 445-467, 2005.

EMELYANOVA, V. E.; Lipid and γ -linolenic acid production by *Mucor inaequisporus*. **Process Biochemistry**, Oxford, v.32, n.3, p.173-177, 1997.

FELFILI, J. M.; NOGUEIRA, P. E.; SILVA JUNIOR, M. C. Composição florística e fitossociologia do cerrado sentido restrito no município de Água Boa – MT. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v.16, n.1, p.103-112, 2002.

- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, p.226-497, 1957.
- FRANKLAND, J. C. Biomass and nutrient cycling by decomposer basidiomycetes. In: FRANKLAND, J. C.; HEDGER J. N.; SWIFT, M. J. **Decomposer basidiomycetes**. London: Cambridge University Press, 1982. p.241-261.
- FRANKLAND, J. C. Ecological methods of observing and quantifying soil Fungi. **Transactions of the Mycological Society of Japan**, Tokyo, v. 31, 89-101, 1990.
- FUNTIKOVA, N. S.; MYSYAKINA, I. S. Synthesis of γ -linolenic acid by Mucoraceous Fungi utilizing exogenous fatty acids. **Microbiology**, New York, v.66, p.76-79, 1997.
- GEMA, H.; KAVADIA, D.; DIMOU, D.; TSAGOU, V. Production of γ -linolenic acid by *Cunninghamella echinulata* cultivated on glucose and orange peel. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.58, p.303-307, 2002.
- GESSNER, M. O.; CHAUVET, E. Ergosterol-to-Biomass Conversion Factors for Aquatic Hyphomycetes. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.502-507, 1993.
- GUNSTONE, F. D. Gamma linolenic acid-occurrence and physical and chemical properties. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v.31, n.2, p.145-161, 1992.
- GUNSTONE, F. D. **Fatty Acid and Chemistry**. Glasglow: Blackie Academic & Professional (Chapman & Hall), 1996. 251p.
- HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, Cambridge, v.95, p.641-655, 1991.
- HAWKSWORTH, D.L. The extent of fungal diversity: where it is to be found, and how much of it is new. In: MMARS, M. T.; SATO, M. I. Z.; TIEDJE, J. M.; HAGLER, L. C. N.; DOBEREINER, J.; SANCHEZ P. S. **Progress in Microbial Ecology**. São Paulo: SBM - Brazilian Society for Microbiology / ICOMÉ - International Committee on Microbial Ecology, 1997. p.11-6.
- HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, Cambridge, v.105, p.1422-1432, 2001.
- HESELTIME, C. W.; ANDERSON, R. F. Microbial production of carotenoids I. Zygosporous and carotene produced by intraespecific and interespecific crosses of *Choanephora* in liquid media. **Mycologia**, Lawrence, v.69, p-449-52, 1957.
- HIGASHIYAMA, K.; FUGIKAWA, S.; PARK, E.; SCHIMIZU, S. Production of Arachidonic acid by *Mortierella* Fungi. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Seoul, v.7, p.252-262, 2002.
- HORROBIN, D. F. Nutritional and Medical importance of Gamma-Linolenic-Acid. **Progress in lipid research**, Oxford, v.31, n.2, p.163-194, 1992.
- HORROBIN, D.F. **Medical roles of metabolites of precursor EFA** Inform, v.6, n.4, p.428-435, 1995.

IBGE. **Folha Corumbataí, SP, escala 1:50.000**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1971.

IMMELMAN, M. DU PREEZ, J. C., KILIAN, S. G. Effect of C:N Ratio on Gamma-linolenic Acid Production by *Mucor circinelloides* Growth of Acetic Acid. **Systematic applied microbiology**, Jena, v.20, p.158-164, 1997.

JEFFERY, J. KOCK, J. L. F.; BOTH A, A.; COETZEE, D.J., BOTES, P. J. NIGAM, S. Enhanced sunflower oil utilization and gamma-linolenic acid production by *Mucor circinelloides* f. *circinelloides* CBS 108.16 in the presence of acetate. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v.13, p.357-358, 1997.

JEFFERY, J.; KOCK, J. L. F; DU PREEZ, J. C.; BAREETSENG, A. S.; COETZEE, D. J.; BOTES P. J.; BOTH A. A.; SCHEWE, T.; NIGAM, S.; Effect of acetate and pH on sunflower oil assimilation by *Mucor circinelloides* f. *circinelloides*. **Systematic and applied microbiology**, Jena, v. 22, n.1, p. 156-160, 1999.

KATES, M. **Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids**. Amsterdam: North-Holland, 3rd ed.,v.2, 1982. 341p.

KAVADIA, A.; KOMAITIS, M.; CHEVALOT, I.; BLANCHARD, F.; MARC I.; AGGELIS, G. Lipid and gamma-linolenic acid accumulation in Strains of zygomycetes growing on glucose. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.78, n.4, p.341-346, 2001.

KENDRICK, A.; RATLEDGE, C. Cessation of polyunsaturated fatty acid formation in four selected filamentous fungi when grown on plant oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.73, n.4, p.431-435, 1996.

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

KENNEDY, M. J., READER, S. L, DAVIES, R. J. Fatty Acid Production Characteristics of Fungi with Particular Emphasis on Gamma Linolenic Acid Production. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.42, p. 625-634, 1993.

KENNEDY, M. J.; READER, S. L.; DAVIES, R. J.; RHOADES, D. A.; SILBY, H. W. The scale up of mycelial shake flask fermentations: a case study of gamma linolenic acid production by *Mucor hiemalis* IRL 51. **Journal of Industrial Microbiology**, Basingstoke, v.13, n.4, p.212-216, 1994.

KENNEDY, M; KROUSE, D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v.23, n.6, p.456-475, 1999.

KORITALA S.; HESSELTINE C. W.; PRYDE E. H.; MOUNTS T. L. Biochemical modification of fats by microorganisms: A preliminary survey. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 64, n.4, p. 509-513, 1987.

KRONKA, F. J. N. **Áreas de domínio do cerrado no Estado de São Paulo**. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 1998. 84p.

- LAWSON, L. D.; HUGHES, B. G. Triacylglycerol structure of plant and fungal oils containing γ -linolenic acid. **Lipids**, Champaign, v.23, p.313-317, 1988.
- LINDBERG A., HANSSON L. Production of γ -linolenic acid by the fungus *Mucor rouxii* on cheap nitrogen and carbon sources. **Applied Microbiol and Biotechnology**, Berlin, v.36, p.26-28, 1991.
- LOPES, A. S. **Solos sob "cerrado". Características, propriedades e manejo**. 2^a ed. Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1984. 162p.
- MARTIN, J. P. Use of acid rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science**, Baltimore, v.69, p.215-32, 1950.
- MCLEAN, R.C; COOK, W.R.I. **Practical field ecology: a guide for the Botany Department of Universities, Colleges and Schools**. London: George Allen, 1968. 215p.
- MILANEZ, A. I. A atuação dos fungos nos ecossistemas. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BOTÂNICA DE SÃO PAULO, IX, 1992, Ilha Solteira,. **Anais**. São Paulo: SBSP/FAPESP, 1995. p.67-72.
- MILANEZ, A. I.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; TRUFEM, S. F. B. Subgrupo E- Microorganismos (Fungos) In: BRITO, M. C. W. de. **Cerrado: Bases para conservação e uso sustentável das áreas de cerrado do estado de São Paulo**. Secretaria de Estado do Meio Ambiente, série PROBIO/SP, 1997. 184p.
- MONTEIRO, R.; AULINO, O. A. Clima balanço hídrico em uma reserva de cerrado no município de Corumbataí, SP. In: **Seminário Regional de Ecologia**, 2, 1981, São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1981. Resumos, p.9.
- MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the Fungi**. 4th ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996. 574p.
- MYCOLOGY GUIDEBOOK COMMITTEE (MSA). **Mycology Guidebook**. Preliminary edition. s.l. Lawrence: The Mycological Society of America., 1970. 942p.
- NANTEL, B.; NEUMANN, P. Ecology of ectomycorrhizal- basidiomycete communities on a local vegetation gradient. **Ecology**, Durham, v.73, n.1, p. 99-117, 1992.
- ODUM, E. P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. 434p.
- PAGANO, S. N.; CÉSAR, O.; LEITÃO FILHO, H. de F. Composição florística do estrato arbustivo-arbóreo da vegetação de cerrado da Área de Proteção Ambiental (APA) de Corumbataí-Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.49, n.1, p.37-48, 1989.
- PALMA, M. S. Atividade da fosfatase ácida em latossolo vermelho amarelo textura média, tratado com vinhaça no município de Corumbataí, SP. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.12, p.7-10, 1988.
- PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Modeling lipid accumulation and degradation in *Yarrowia lipolytica* cultivated on Industrial Fats. **Current Microbiology**, New York, v.46, p.398-402, 2003.

- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; DA SILVA BOLZANI, V.; LOPES, N. P. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v.25, supl.1, p.45-61, 2002.
- PRAT, N.; WARD, J.V. The tamed river. In: MARGALEF, R. **Limnology now: A paradigm of planetary problems**. Amsterdam: Elsevier, 1994. p.219 -36.
- PRIMAVESI, A. **Manejo ecológico do solo: a agricultura em regiões tropicais**. 9^a ed. São Paulo: Nobel, 1990. 549p.
- PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**. v1. 1^a ed. Santa Cruz do Sul: Editora da UNISC, 1998. 606p.
- RADWAN, S. S. Sources of C20-polyunsaturated fatty acids for biotechnological use. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.35, p.421-430, 1991.
- RATLEDGE, C. Microorganisms for lipids. **Acta biotechnologica**, Weinheim, v.11, n.5, p.429-438, 1991.
- RATLEDGE, C. Microbial lipids: commercial realities or academic curiosities. In: KYLE, D. J.; RATLEDGE, C. **Industrial Applications of Single Cell Oil**. Illinois: American Oil Chemists' Society, 1992. p.1-15.
- RATLEDGE, C. Regulation of lipid accumulation in oleagious micro-organisms. **Biochemical Society Transactions**, Portland, v.30, p.1047-1050, 2002.
- RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production, **Biochimie**, Paris, v.86, p.807-815, 2004.
- RAYMUNDO JR., O. **Contribuição da serrapilheira no processo de humificação em latossolo vermelho amarelo, textura média, sob vegetação de cerrado**. 1999. 166f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho. Rio Claro. 1999.
- RAYMUNDO JR., O. **Fungos filamentosos, Actinomicetos e Ácidos Húmicos, em diferentes profundidades de latossolo vermelho amarelo textura média em área de cerrado, no município de Corumbataí**. 1992. 149f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho. Rio Claro. 1992.
- RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, New York, v.42, p.265-70, 1950.
- ROUX, M. P.; KOCK, J. L. F.; BOTHA; du PREEZ, J., WELLS, C.; BOTES, P. J. *Mucor*- a source of cocoa butter and gamma-linolenic acid. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v.10, p.417-422, 1994.
- RUEGGER, M. J. S. **Atividade enzimática e produção de ácido γ -linolênico por fungos filamentosos isolados do solo, da estação ecológica de Juréia-Itatins, SP**.2001. 82f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada). Universidade Júlio Mesquita Filho. Rio Claro, 2001.

SANCHOLLE, M.; LÖSEL, D. Lipids in Fungal Biotechnology. In: KÜCK, U. **The Mycota II: A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research-Genetics and Biotechnology**. v.2. cap.20, Springer Verlag, 1995. p.339-367.

SCHIPPER, M. A. A. A study on variability in *Mucor hiemalis* and related species. *Studies in Micology, Baarn*, v.4, p.1-39, 1973.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H. **Decomposição e sucessão de fungos de folhas de *Ocotea pulchella* (Nees) Mez. em solo sob cerrado, tratado com vinhaça, no município de Corumbataí, SP.** 1988. 195f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho. Rio Claro. 1988.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Effects of vinasse upon the decomposition rate of *Ocotea pulchella* leaves in cerrado soil. ***Pedobiologia***, Jena, v.35, p.387-92, 1991.

SESSLER, A. M.; NTAMBI, J. M. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. ***Journal of Nutrition***, Bethesda, v.128, p.923-926, 1998.

SHIMIZU, S.; KAWASHIMA, H.; AKIMOTO, K.; SHINMEN, Y.; YAMADA, H. Conversion of linseed oil to an eicosapentaenoic acid-containing oil by *Mortierella alpina* at low temperature. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, Berlin, v.32. p.1-4, 1989.

SHINMEN, Y.; SHIMIZU, S.; AKIMOTO, K.; KAWASHIMA, H.; YAMADA, H. Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi. Selection of a potent producer and optimization of culture conditions for large-scale production, ***Applied Microbiology and Biotechnology***, Berlin, v.31, n.1, p.11-16, 1989.

SOMASHEKAR, D.; VENKATESHWARAN, G.; SRIVIDYA, C.; KRISHNANAND, K.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B. R. Efficacy of extraction methods for lipid and fatty acid composition from fungal cultures. ***World Journal of Microbiology & Biotechnology***, Dordrecht, v.17, p.317-320, 2001.

SÖNNICHSEN, M.; MÜLLER, B.W. A rapid and quantitative method for total fatty acid analysis of fungi and other biological samples. ***Lipids***, Champaign, v.34,n.12, 1999.

SUGIURA, T.; KOBAYASHI, Y.; OKA, S.; WAKU, K. Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonylglycerol and their possible physiological significance. ***Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids***, Kidlington, v.66, n.2/3, p.173-192, 2002.

SUGIURA, T.; KONDO, S.; SUKAGAWA, A.; TONEGAWA, T.; NAKANE, S.; YAMASHITA, A.; ISHIMA, Y.; WAKU, K. Transacylase-mediated and phosphodiesterase-mediated synthesis of N- arachidonoyl ethanolamine, an endogenous cannabinoid-receptor ligand, in rat brain microsomes. Comparison with synthesis from free arachidonic acid and ethanolamine. ***European Journal of Biochemistry***, Oxford, v.240, p.53-62, 1996.

TAUK, S. M. **Efeitos de doses cumulativas de vinhaça em algumas propriedades do solo sob cerrado e do solo de cultura de milho e cana-de-açúcar nos municípios de Corumbataí e de Rio-Claro, SP.** 1987. 349f. Tese (Livre Docência)-Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Rio Claro, 1987.

TAUK, S. M. Effects of cumulative doses of vinasse on soil microorganisms in cerrado. **Pedobiologia**, Jena, v.34, n.1, p. 69-75, 1990.

TAUK-TORNISIELO S. M.; GARLIPP, A.; RUEGGER M.; ATTILI D. S.; MALAGUTTI E. Soilborne filamentous fungi in Brazil. **Journal of basic microbiology**, Berlin, v.45, n.1, p.72-82, 2005.

TAUK-TORNISIELO, S. M.; RUEGGER, M. J. S. Alguns Aspectos da Microbiota do Solo Sob Vegetação de Cerrado. Tratado Com Vinhaça. No Município de Corumbataí, SP. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.18, p.67-76, 1987.

TAUK-TORNISIELO, S. M.; MALAGUTTI, E. N. Cumulative effects of vinasse on the characteristics of red-yellow latosols under cerrado vegetation. **International Journal of Ecology and Environmental Science**, New Delhi, v.23, p.261-69, 1997.

TEIXEIRA, M. I. J. G.; ARAUJO, A. R. B.; VALERI, S. V.; RODRIGUES, R. R. Floristic and phytosociology of area of cerrado "scritu sensu", in northeast region of São Paulo State, Brazil. **Bragantia**, Campinas, v.63, n.1, p.1-11, 2004.

TRUFEM, S. F. B. Taxonomia de zigomicetos. In: BONONI, V. L. R. **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas**. São Paulo: Editora da Secretaria de Estado do Meio Ambiente., 1998. 181p.

TOTANI, N.; SOMEYA, K.; OBA, K. Industrial production of arachidonic acid by *Mortierella*. In: KYLE, D. J.; RATLEDGE, C. **Industrial Applications of Single Cell Oils**. Champaign: AOCS Press, 1992. p.52-60.

WAINWRIGHT, M. **An introduction to fungal biotechnology**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1992. 202p.

WARCUP, J. H. The soil plate method for isolations of fungi from soil. **Nature**, London, v.166, p.117-118, 1950.

WARCUP, J. H. The ecology of soil fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.34, p.376-399, 1951.

WARD, S.; SINGH, A. Omega 3/6 fatty acids: Alternative sources of production. **Process Biochemistry**, Barking, v. 40, p.3627-3672, 2005.

WEETE, J. D.; GANDHI, S. Potential for fungal lipids in Biotechnology. In: AURORA, D. K., ELANDER, R. P.; MUKERJI. **Handbook of Applied Mycology: Fungal Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, Inc, 1992. v.4, p.377-400.

WEETE J. D.; SHEWMAKER F.; GANDHI S. R. γ -linolenic acid in zygomycetous fungi : *Syzygites megalocarpus*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.75, n.10, p.1367-1372, 1998.

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

ANEXOS



Foto 1. Montagem do biorreator

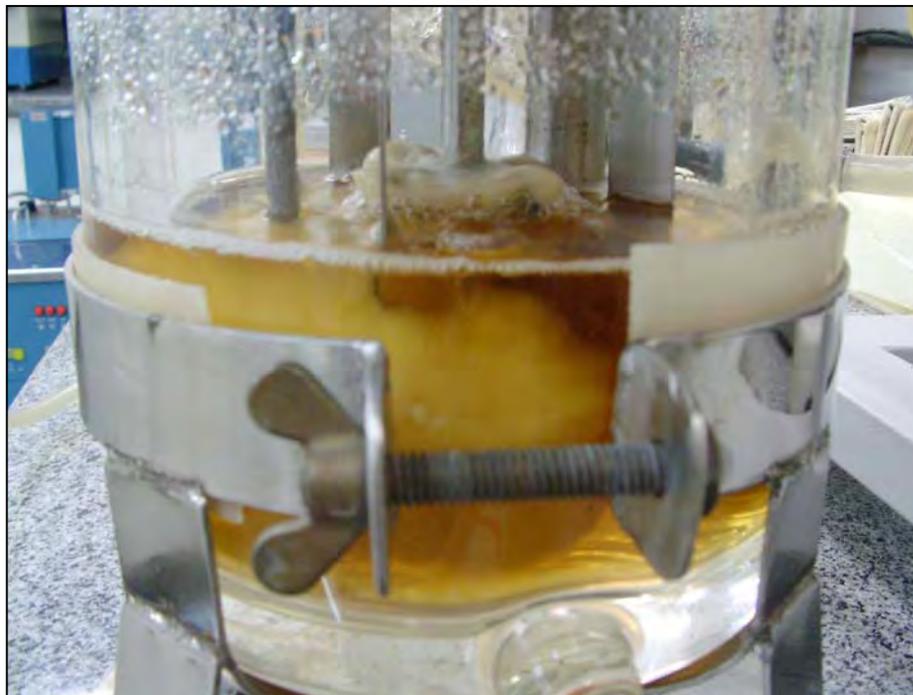


Foto 2. Vista em close de micélio crescido



Foto 3. Micélio após 6 dias de crescimento ainda dentro do biorreator (Linhagem 131)



Foto 4. Micélio crescido em biorreator separado do meio de cultura (Linhagem M131)



Foto 5. Micélio filtrado do meio de cultura (fungo crescido sem óleo de girassol, Linhagem M131)



Foto 6. Micélio crescido em erlenmeyers, após separado do meio de cultura e lavado (fungo crescido sem óleo, Linhagem M131)



Foto 7. Micélio sendo filtrado do meio de cultura (fungo crescido com óleo de girassol)



Foto 8. Micélio crescido em erlenmeyers, após separado do meio de cultura e lavado (fungo crescido com óleo de girassol)



Foto 9. Ensaio em escala de frascos de 125mL em agitador orbital



Foto 10. Micélio crescido em frasco de 125mL (Linhagem M131)

ESTAÇÃO METEOROLÓGICA DE RIO CLARO - CEAPLA - IGCE - UNESP
 PREFEITURA MUNICIPAL DE RIO CLARO - DAEE - PREFIXO D4 - 112M

LATITUDE: 22° 23' S
 LONGITUDE: 47° 32' W
 ALTITUDE: 626,5 m

BOLETIM PLUVIOMÉTRICO
 (Precipitação diária)

ANO: 2002

ALTURAS DIÁRIAS DE CHUVA (mm) *

DIA	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
1		0,6			0,2			13,2	4,4	0,2		
2	22,7	41,7		0,3				46,2		2,1		11,0
3	3,6		2,2		1,3			45,0				
4			4,2	3,8				0,1				
5					5,0						28,7	43,0
6			17,6		14,5							
7	14,7	26,4						7,8	10,9			1,2
8	26,8	22,0										1,9
9	37,1	33,0										39,4
10	5,8	50,6										0,2
11		17,1									6,7	8,2
12	0,9						3,9				2,8	1,9
13	55,2	0,3					0,9				49,1	
14	15,2	11,1	34,4				0,2				8,5	0,8
15	1,0	10,8	4,7						0,3		27,6	14,5
16	3,0	1,0									1,6	45,6
17		1,3			0,2				1,4			55,6
18			0,7								16,8	
19					0,4						43,4	
20	13,4				12,8				2,5			
21	6,5	11,2	0,9		20,4				16,2			8,0
22		24,2	0,4		38,6		0,2			1,4	12,5	17,5
23		10,2			0,5		0,4		1,3			
24	1,8	15,2	4,5						1,7			
25	0,3		15,3									0,7
26	33,5		10,0							13,7	23,8	5,1
27	0,6	0,8								0,4	2,1	
28	0,3	0,9									7,9	
29	32,4										36,9	
30	8,9							13,5		26,2	19,8	
31	2,2									18,4		1,6
Total	285,9	278,4	94,9	4,1	93,9	0,0	5,6	125,8	38,7	62,4	288,2	256,2
%	18,64	18,15	6,19	0,27	6,12	0,0	0,37	8,20	2,52	4,07	18,79	16,70
Máx	55,2	50,6	34,4	3,8	38,6	0,0	3,9	46,2	16,2	26,2	49,1	55,6
NDC	21	18	11	2	10	0	5	6	8	7	15	17

Precipitação máxima: 55,6 Dia: 17 Mês: DEZEMBRO IM/24hs

Precipitação total anual: 1534,1mm

Total anual de dias de chuva: 120

Observação:- NDC = Número de dias com chuva - IM/24horas = Intensidade média em 24 horas

- (*) = acumuladas entre 07 horas do dia anterior e 07 horas do dia seguinte

ESTAÇÃO METEOROLÓGICA DE RIO CLARO - CEAPLA - IGCE - UNESP
 PREFEITURA MUNICIPAL DE RIO CLARO - DAEE - PREFIXO D4 - 112M

LATITUDE: 22° 23' S
 LONGITUDE: 47° 32' W
 ALTITUDE: 626,5 m

BOLETIM PLUVIOMÉTRICO
 (Precipitação diária)
 ANO: 2003
 ALTURAS DIÁRIAS DE CHUVA (mm) *

DIA	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
1		0,4										44,5
2	1,8				0,2						26,8	23,7
3					15,4							24,2
4	83,4		31,4			5,3						20,9
5	15,4	0,4		13,2								3,6
6	27,3	0,2	0,9		19,6	4,0					1,0	34,0
7			0,6	2,9		5,6		2,8			17,2	
8			7,3					3,2		12,7	0,3	0,4
9			8,9			0,7		3,1				15,5
10			0,3					1,8		4,3		7,4
11	0,4		2,8	2,5			3,5		2,3	35,5		
12	43,0		2,3	0,9						12,7		
13	6,3	4,6							0,2		5,7	
14	0,4	33,0							0,2		5,7	
15		12,1										2,2
16		6,8									24,5	
17	4,8	3,5	27,1						19,3		66,5	10,3
18	35,1	6,1									41,5	
19	1,0	34,4									8,2	
20	4,0		0,5	13,6								
21		9,3	9,1	6,0								3,8
22	82,3	2,5	2,7	3,2						1,5		10,2
23	11,1									0,2		7,1
24	16,6				10,6						15,5	
25	9,3										9,4	
26	2,0							5,2				
27	1,6								3,6	15,6	6,7	
28	23,4		3,0							9,9		0,2
29	20,2							0,2		3,2		13,9
30	6,1									13,6		
31	15,7											5,6
Total	411,2	113,3	96,9	42,3	45,8	15,6	3,5	16,3	25,6	109,2	229,0	227,5
%	30,77	8,48	7,25	3,17	3,43	1,17	0,26	1,22	1,92	8,17	17,14	17,03
Máx	83,4	34,4	31,4	13,6	19,6	5,6	3,5	5,2	19,3	35,5	66,5	44,5
NDC	22	12	13	7	4	4	1	6	5	10	13	17

Precipitação máxima: 83,4 Dia: 4 Mês: JANEIRO IM/24hs

Precipitação total anual: 1336,2mm

Total anual de dias de chuva: 114

Observação: - NDC = Número de dias com chuva - IM/24horas =
 Intensidade média em 24 horas

- (*) = acumuladas entre 07 horas do dia anterior e 07 horas do dia seguinte

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)