

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL – UFMS

Campus de CAMPO GRANDE

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM - SBBq

LUÍS HENRIQUE CAMARGO COSTA

**SÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS (PUFAs) A
PARTIR DE GLICEROL UTILIZANDO FUNGOS FILAMENTOSOS**

CAMPO GRANDE - MS

Junho de 2018

LUÍS HENRIQUE CAMARGO COSTA

**SÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS (PUFAs) A
PARTIR DE GLICEROL UTILIZANDO FUNGOS FILAMENTOSOS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Rita Marques

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Sayuri Myamoto

CAMPO GRANDE - MS

Junho de 2018

TERMO DE APROVAÇÃO

LUÍS HENRIQUE CAMARGO COSTA

SÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS (PUFAs) A PARTIR DE GLICEROL UTILIZANDO FUNGOS FILAMENTOSOS

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular)

Campo Grande, 08 de junho de 2018.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Maria Rita Marques

Instituto de Biociências - UFMS

Prof. Dr. Dênis Pires de Lima

Instituto de Química - UFMS

Prof. Dr. Edson dos Anjos dos Santos

Instituto de Biociências - UFMS

*Aos meus pais, pelo incentivo e
apoio em todas as minhas
escolhas e decisões.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ninguém faz nada sozinho, ninguém chega a lugar algum sem apoio ou orientação, por isso gostaria de prestar meus profundos agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Em especial, agradeço:

Aos meus pais, pelo apoio incondicional.

À Prof^a. Dr^a. Maria Rita Marques por ter me aceitado como aluno, pela orientação e confiança.

À Prof^a. Dr^a. Felicia Megumi Ito, pela amizade e orientação.

Aos Prof. Dr Adilson Beatriz e Prof. Dr. Dênis Pires de Lima por permitirem o uso dos laboratórios no Instituto de Química da UFMS.

À Prof^a. Dr^a. Giovana Cristina Giannesi por ceder amostras de fungos.

À técnica Clarice pelo auxílio nas atividades desenvolvidas na Micoteca.

Ao doutorando Carlos pela permissão para utilização dos fungos isolados e pelo auxílio nas atividades na Micoteca.

Aos doutorandos do LP4 Rejane Diniz e Vinícius pela amizade e auxílio na obtenção e interpretação dos espectros de RMN e IV.

Ao químico Luiz Leonardo pela disposição e eficiência na realização das análises de CG/MS.

A doutoranda Ingrid Duarte, pela amizade e por disponibilizar sua bancada para que eu pudesse trabalhar.

Ao IFMS pelas inúmeras liberações do trabalho concedidas que me ajudaram muito para a realização desse trabalho.

Aos órgãos de fomento Capes e CNPq, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Em função da crescente busca por biocombustíveis, a produção de biodiesel tende a aumentar gerando uma preocupação com o seu principal subproduto: o glicerol. Devido ao baixo valor comercial e o potencial impacto ambiental negativo, atribuído à superprodução do glicerol, torna-se fundamental encontrar formas alternativas de conversão deste subproduto em produtos com maior valor agregado. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo selecionar fungos endofíticos isolados de *Aspilia grazielae* (Santos) com potencial para produção de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) utilizando o glicerol como substrato. Cinquenta e uma cepas isoladas da planta, sendo 18 do gênero *Aspergillus* spp.; 13 do gênero *Colletotrichum* spp.; 10 do gênero *Penicillium* spp. e 10 do gênero *Fusarium* spp. foram submetidas a testes de pré-seleção. Destas cepas, *Aspergillus* sp. (FF5), *Aspergillus* sp. (FF3) e *Penicillium* sp. (BR10) foram capazes de produzir lipídios utilizando glicerol como fonte de carbono. O perfil dos ácidos graxos foi determinado pela análise de CG/MS, onde foi possível detectar os ácidos graxos majoritários: linolênico (C18:3) e linoleico (C18:2), correspondendo a 90,04 % produzidos pela cepa *Aspergillus* spp.(FF5), 89,61 % produzidos por *Aspergillus* spp.(FF3) e 75,69 % produzidos por *Penicillium* spp. (BR10). A utilização do glicerol como fonte de carbono para produção de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) através de ensaios de biotransformação deve ser considerada uma alternativa plausível para absorver e agregar valor ao excedente deste composto proveniente da indústria de biocombustíveis.

Palavras-chave: *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Aspilia grazielae*, biotransformação, lipídios.

ABSTRACT

Due to the increasing demand for biofuels, biodiesel production tends to increase and this has generated a concern with its main by-product: glycerol. Due to the low commercial value and the potential negative environmental impact attributed to the overproduction of glycerol, it is fundamental to find alternative ways of converting this by-product into products with higher added value. In this context, this work aimed to select endophytic fungi isolated from *Aspilia grazielae* (Santos) with potential for the production of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) using glycerol as a substrate. Fifty one strains isolated from the plant, 18 of the genus *Aspergillus* spp.; 13 of the genus *Colletotrichum* spp.; 10 of the genus *Penicillium* spp. and 10 of the genus *Fusarium* spp. were submitted to pre-selection tests. Of these strains, *Aspergillus* spp. (FF5), *Aspergillus* spp (FF3) and *Penicillium* spp. (BR10) were able to produce lipids using glycerol as the carbon source. The fatty acid profile was determined by GC / MS analysis, where it was possible to detect the major fatty acids: linolenic (C18: 3) and linoleic (C18: 2), corresponding to 90.04% produced by the strain *Aspergillus* sp. (FF5), 89.61% produced by *Aspergillus* sp. (FF3) and 75.69% produced by *Penicillium* sp. (BR10). The use of glycerol as a carbon source for the production of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) through biotransformation assays should be a plausible alternative for absorption and add value to the surplus of this compound from the biofuels industry.

Key-words: *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Aspilia grazielae*, filamentous fungi, lipids.

SUMÁRIO

Agradecimentos	4
Resumo	5
Abstract	6
Lista de figuras	9
Lista de tabelas.....	11
Lista de abreviaturas e siglas.....	12
1 Introdução.....	1
2 Revisão da literatura	2
2.1 Glicerol.....	2
2.1.1 Utilização do glicerol.....	4
2.2 Microrganismos capazes de produzir e armazenar lipídios	6
2.2.1 Síntese e armazenamento de lipídios em microrganismos	7
2.3 Ácidos Graxos Poli-insaturados (PUFAs)	10
2.3.1.....	11
Importância dos PUFAS	11
3. Objetivos.....	13
3.1. Objetivo geral	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
4. Material e Métodos	14
4.1 Material Biológico	14
4.2 Glicerol.....	14
4.3 Pré-seleção dos fungos.....	15
4.3.1 Atividade lipolítica.....	15
4.3.2 Meio de cultura GSB (Glicerol, Sais e Biotina).....	15
4.4 Preparo do inóculo	15
4.5 Ensaio de biotransformação	15
4.6 Extração de compostos	16
4.6.1 Extração de lipídios pelo método de Bligh & Dyer	17
4.6.2 Extração líquido- líquido com acetato de etila.....	17
4.7 Purificação dos compostos.....	17
4.8 Métodos para determinação dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs)	18
4.8.1 Análise de IV-TF.....	18
4.8.2 Análise de RMN de ¹ H.....	18
4.8.3 Derivatização e Análise em CG/MS.....	18

5. Resultados e discussão	19
5.1 Pré-seleção da atividade lipolítica	19
5.2 Crescimento no meio GSB	20
5.3 Biotransformação	23
5.4 Extração dos compostos	27
5.5 Análise dos espectros de IV-TF.....	29
5.6 Análise dos espectros RMN de ^1H	34
5.7. Análise de CG-MS	44
6. Conclusão.....	48
7. Referências Bibliográficas.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do glicerol.	2
Figura 2. Reação de transesterificação de triacilglicerídeos.	3
Figura 3. Produtos obtidos a partir do glicerol.	5
Figura 4. Síntese de lipídios neutros. O glicerol-3-P usado na síntese de TAG é formado a partir do glicerol que também é convertido em diidroxiacetona e metabolizado até a formação citrato. O acetil-CoA citosólico é obtido através da clivagem do citrato pela ATP-citrato-liase (ACL1 e ACL2). Então acetil-CoA é convertido em malonil-CoA através da acil carboxilase (ACC1) e a cadeia de ácidos graxos cresce através da adição de acetil-CoA a uma unidade de malonil-CoA seguida da incorporação de mais moléculas de malonil-CoA (Ciclo de alongamento), obtendo assim o Acil-CoA. Na síntese de TAG três grupos acila são adicionados ao glicerol-3-P, onde primeiramente ocorre a acilação do glicerol-3-P na posição sn-1 para gerar acil glicerol-3-P (ácido lisofosfatídico; LPA), posteriormente LPA sofre mais uma acilação na posição sn-2 pela ácido lisofosfatídico aciltransferase (SLC1) para gerar ácido fosfatídico (PA). O PA é desfosforilado pela enzima ácido fosfotransferase (PAP), obtendo diacilglicerol (DAG). Para a síntese final de TAG, DAG é acilada na posição sn-3, através de uma acil-CoA-dependente ou acil-CoA-independente. Na via de acil-CoA-dependente, o terceiro grupo acila é fornecido pela acil-CoA, enquanto que na acil-CoA-independente, é fornecido por um glicerofosfolipídio. A formação de esteres de esterol (EE) envolve a reação de uma molécula de ácido graxo (Acil-CoA) com um grupo hidroxila de esteróis, essa reação é catalisada pelas enzimas ARE1 e ARE2 (SEIP, et al., 2013)	8
Figura 5. . Os ácidos graxos não esterificados são classificados de acordo com a presença, número e geometria de duplas ligações (A). Abreviaturas: MUFA, ácido graxo monoinsaturado; SFA, ácido graxo saturado; PUFA, ácido graxo poli-insaturado; O PUFA é mostrado nas configurações <i>cis</i> como em <i>trans</i> (B) Caminhos metabólicos da síntese de ácidos graxos ω -3 e ω -6. O ácido alfa-linolênico e o ácido linoleico são os precursores de PUFAs n-3 e 6, respectivamente. Diferentes enzimas atuam (dessaturases e elongases) convertem esses precursores em diferentes PUFAs de cadeia longa FONTE:(ELINDERF;LIIN, 2017, Adaptado pelo autor).	11
Figura 6. Representação esquemática do ensaio de biotransformação. FONTE: (ITO, 2007).	16
Figura 7. Ensaio de atividade lipolítica após 24h com um isolado de <i>A.grazielae</i> . É possível detectar o halo lipolítico em azul e o crescimento radial do fungo.	20
Figura 8. B Cepa de <i>Colletotrichum</i> spp. demonstrando o crescimento no meio GSB	22
Figura 9. Monitoramento de pH em função do tempo. Amostras C01 controle (fungo+meio de cultura); T01.1, T01.2 e T01.3 (fungo+meio de cultura+glicerol).	23
Figura 10. Monitoramento de pH em função do tempo. Amostras C02 controle (fungo+meio de cultura); T02.1, T02.2 e T02.3 (fungo+meio de cultura+glicerol).	23
Figura 11. Monitoramento de pH em função do tempo. Amostras C03 controle (fungo+meio de cultura); T03.1, T03.2 e T03.3 (fungo+meio de cultura+glicerol).	24
Figura 12. Monitoramento de pH em função do tempo. Amostras C04 controle (fungo+meio de cultura); T04.1, T04.2 e T04.3 (fungo+meio de cultura+glicerol).	24
Figura 13. Monitoramento de pH em função do tempo. Amostras C05 controle (fungo+meio de cultura); T05.1, T05.2 e T05.3 (fungo+meio de cultura+glicerol).	24
Figura 14. Monitoramento de pH em função do tempo. Amostras C06 controle (fungo+meio de cultura); T04.1, T04.2 e T04.3 (fungo+meio de cultura+glicerol).	25

Figura 15. Monitoramento de pH em função do tempo. Amostras C07 controle (fungo+meio de cultura); T07.1, T07.2 e T07.3 (fungo+meio de cultura+glicerol).	25
Figura 16. Monitoramento de pH em função do tempo. Amostras C08 controle (fungo+meio de cultura); T08.1, T08.2 e T08.3 (fungo+meio de cultura+glicerol).	25
Figura 17. Monitoramento de pH em função do tempo. Amostras C09 controle (fungo+meio de cultura); T09.1, T09.2 e T09.3 (fungo+meio de cultura+glicerol).	26
Figura 18. Monitoramento de pH em função do tempo. Amostras C10 controle (fungo+meio de cultura); T10.1, T10.2 e T10.3 (fungo+meio de cultura+glicerol).	26
Figura 19. Espectro de Infravermelho do glicerol utilizado como fonte de carbono nos ensaios de biotransformação.....	30
Figura 20. Espectro de IV – Cepa <i>Aspergillus</i> spp (FF5).	31
Figura 21. Espectro de IV – <i>Aspergillus</i> spp (FF3)	32
Figura 22. Espectro de IV – <i>Penicillium</i> spp (BR10).....	33
Figura 23. Espectro de RMN de ^1H obtido do extrato lipídico da cepa de <i>Aspergillus</i> spp. (FF5).....	35
Figura 24. Espectro de RMN de ^1H obtido do extrato lipídico da cepa de <i>Aspergillus</i> spp. (FF5).....	36
Figura 25. Triacilglicerol composto pelos ácidos graxos.....	37
Figura 26. Espectro de RMN de ^1H obtido do extrato lipídico da cepa de <i>Aspergillus</i> spp. (FF3).....	38
Figura 27. Espectro de RMN de ^1H obtido do extrato lipídico da cepa de <i>Aspergillus</i> spp. (FF3).....	39
Figura 28. Triacilglicerol, compostos pelos ácidos graxos.....	40
Figura 29. Espectro de RMN de ^1H obtido do extrato lipídico da cepa de <i>Penicillium</i> spp. (BR10).....	41
Figura 30. Espectro de RMN de ^1H obtido do extrato lipídico da cepa de <i>Penicillium</i> spp. (BR10).....	42
Figura 31. Molécula de triacilglicerídeo	43
Figura 32. Cromatograma referente a cepa <i>Aspergillus</i> spp. (FF5) obtido após derivatização.	44
Figura 33. Cromatograma referente a cepa <i>Aspergillus</i> spp. (FF3) obtido após derivatização.	45
Figura 34. Cromatograma referente a eferente a cepa <i>Penicillium</i> spp. (BR10) obtido após derivatização.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do glicerol (BEATRIZ et al., 2011).	3
Tabela 2. Características Físico-químicas do glicerol utilizado neste trabalho.	14
Tabela 3. Tamanho da colônia e halo de lipólise em função do tempo de incubação.	19
Tabela 4. Crescimento radial em meio de cultura GSB.....	21
Tabela 5. Fungos escolhidos para o ensaio de biotransformação.....	22
Tabela 6. Rendimento das extrações líquido-líquido e Bligh & Dyer.	28
Tabela 7. Atribuição das bandas de absorção de IV-TF a grupos funcionais do glicerol.	30
Tabela 8. Atribuição das bandas de absorção de IV <i>Aspergillus</i> spp. (FF5).....	31
Tabela 9. Atribuição das bandas de absorção de IV <i>Aspergillus</i> spp. (FF3).....	32
Tabela 10. Atribuição das bandas de absorção de IV <i>Penicillium</i> spp (BR10)	33
Tabela 11. Atribuição de sinais	37
Tabela 12. Atribuição de sinais	40
Tabela 13. Atribuição de sinais	43
Tabela 14. Porcentagem do perfil dos ácidos graxos produzidos.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC – Acil carboxilase

ACL – Citrato-liase

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível

AOX – Acil-CoA oxidase

ARE1 – Gene que codifica a enzima Acil-CoA: esterol aciltransferase

ARE2 – Gene que codifica a enzima Acil-CoA: esterol aciltransferase

BDA – Ágar Batata Dextrose

BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio

C/N – Relação entre a concentração de carbono e nitrogênio no meio

DAG – Diacilglicerol

DHA – Ácido Docosa-hexaenóico

DHAP – Diidroxidacetona fosfato

EE – Ésteres de esterol

EM – Enzima málica

IV-TF – Infravermelho com Transformada de Fourier

GSB – Ágar Glicerol Sais e Bile

IUPAC – Internacional Union of Pure and Applied Chemistry

MUFA – Ácidos Graxos Monoinsaturados

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

PA – Ácido fosfatídico

PAP – Enzima ácido fosfohidrolase fosfatídica

pH – Potencial Hidrogeniônico

PNPB– Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel

PUFAs – Ácidos Graxos Poli-insaturados

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SEAD – Secretaria Especial de Agricultura Familiar e Desenvolvimento Agrário

SFA – Ácidos Graxos Saturados

SLC1 – Ácido lisofasfatídico aciltransferase

TAG – Triacilglicerídeos

1 INTRODUÇÃO

Apesar dos grandes avanços tecnológicos e incentivos para a produção de biocombustíveis, a maior parte da energia consumida no mundo origina-se do gás natural, do carvão e principalmente do petróleo. Entretanto, o consumo exacerbado de energia de origem fóssil ao longo dos anos contribuiu com o aumento da poluição e consequentemente, com o aumento do efeito estufa e as mudanças drásticas do clima no mundo (BELGIN, et al., 2008).

Atualmente, a busca por fontes energéticas limpas e/ou renováveis tem se tornado cada vez mais necessária, como forma de diminuir a poluição e seus efeitos no meio ambiente e dessa forma promover o desenvolvimento sustentável. Sendo assim, fontes de energias renováveis como o biodiesel e o etanol se apresentam como uma alternativa eficiente na substituição dos combustíveis fósseis (CARDOSO, et al. 2017)

A produção mundial de biodiesel vem aumentando nos últimos anos. No Brasil o cenário não é diferente; no ano de 2015 a produção anual foi recorde chegando 3.937.269 m³ (BRASIL, 2016). Esse grande salto na produção brasileira se deve principalmente à criação do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) em 2005, que tem como objetivo diminuir a dependência do diesel importado bem como fomentar o desenvolvimento de biocombustíveis. O PNPB estrutura toda a cadeia produtiva do biodiesel e regula o mercado nacional desse biocombustível. Dez anos após o lançamento do PNPB, o programa alavancou o número de investimentos privados no setor de biodiesel em praticamente todo o Brasil e o mercado brasileiro deste biocombustível deixou de ser quase inexistente para figurar entre os maiores do mundo juntamente com Estados Unidos e Alemanha (BRASIL, 2016).

Além do PNPB, a Lei 11.097/2005 estabeleceu percentuais mínimos da mistura do biodiesel ao diesel, sendo que anualmente, a mistura de biodiesel puro (B100) ao óleo diesel passou a ser obrigatória, e os percentuais de adição têm variado as misturas existentes, sendo que no ano de 2018 esse percentual passou a ser de 10% (MOTA, SILVA; GONÇALVES, 2009). Segundo cálculos da Agência Nacional do Petróleo e Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) em conjunto com Agroecologia e Energias Renováveis que integra a Secretaria Especial de Agricultura Familiar e Desenvolvimento Agrário (SEAD) estima-se que o consumo em 2017 tenha sido na ordem de 4,2 bilhões de litros de diesel (BRASIL, 2016).

Todos os avanços na cadeia produtiva do biodiesel ainda não são suficientes para criar soluções tecnológicas para o principal subproduto: o glicerol. De uma

maneira geral, a produção de biodiesel gera cerca de 10% de glicerol bruto. A falta de alternativas para novas aplicações do glicerol e o excesso produzido pelas plantas produtoras de biodiesel, levam à queda no preço deste produto no mercado internacional. Desta forma, como a produção de biodiesel tende a aumentar em função da crescente busca de combustíveis renováveis, será gerado um volume cada vez maior de glicerol. Os efeitos mais claros deste fenômeno são: a desvalorização crescente do preço da glicerol no mercado e o potencial impacto ambiental negativo, ligado a essa superprodução (JOHNSON & TACONI, 2007; BEHR et al., 2008; WILLKE & VORLOP, 2008; DROBOWOLSKI, 2016).

Considerando a crescente demanda na produção de biodiesel, torna-se urgente e necessária a criação de novas aplicações para o glicerol tendo em vista a excessiva produção dessa substância (BEATRIZ et al., 2011). A conversão do glicerol por vias biotecnológicas em produtos de importância comercial constitui uma das alternativas mais promissoras para seu aproveitamento (PAPANIKOLAOU et al., 2008; SILVA, MACK; CONTIERO, 2009), podendo ser utilizado com sucesso como fonte de carbono, por exemplo, por diferentes microrganismos na produção de lipídios (MORITA et al., 2007; HE et al., 2017).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Glicerol

O glicerol comumente conhecido como glicerina, é um tri-álcool com três carbonos, tendo como nome oficial pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) 1,2,3-propanotriol (Figura 1). É um líquido incolor, com gosto adocicado, sem cheiro e muito viscoso. O nome glicerol deriva da palavra grega *glykys*, doce (BEATRIZ et al., 2011).

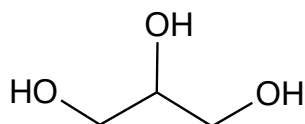


Figura 1. Estrutura química do glicerol

Pode ser originário de fontes naturais ou da indústria petroquímica, onde a produção de glicerol atualmente está relacionada ao processo de transesterificação, que é uma das etapas para a produção do biodiesel, em uma reação onde um triacilglicerol reage com um álcool simples, em geral, metanol ou etanol (Figura 2). A reação é catalisada por um ácido, enzimas ou uma base, sendo o hidróxido de sódio e

hidróxido de potássio (NaOH ou KOH) os mais utilizados. Nessa reação, as moléculas de triacilgliceróis são transformados em ésteres e glicerol.

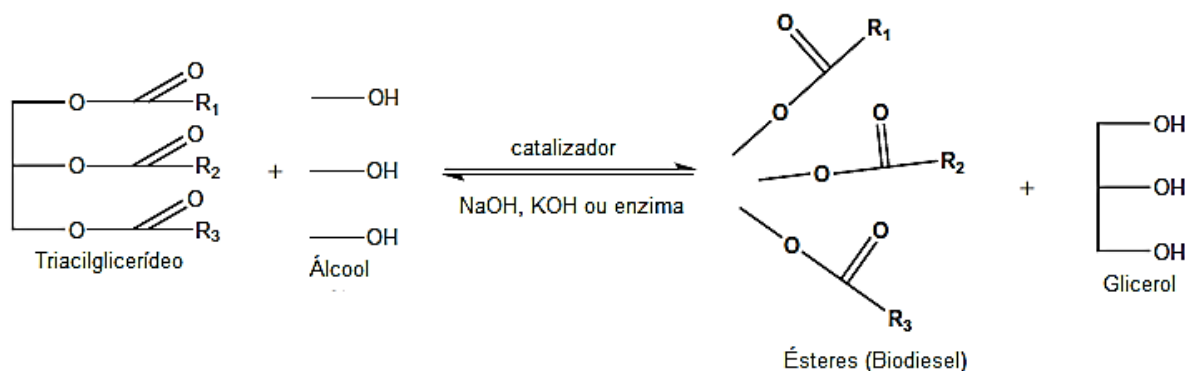


Figura 2. Reação de transesterificação de triacilglicerídeos.

As propriedades físicas e químicas únicas do glicerol (Tabela 1) e sua natureza não tóxica, tornam este composto uma matéria-prima renovável compatível com várias aplicações. O glicerol é usado principalmente como um produto químico de *commodities* em várias indústrias de síntese química, alimentos e farmacêuticas. Pelo fato da forma bruta conter impurezas como catalisadores, álcoois, ácidos graxos e sais, pode ser destilada para obtenção do glicerol puro, mas o custo da destilação e da depuração é comparativamente maior do que o preço do mercado, o que torna o processo não atrativo economicamente (MEHER et al., 2006; DEMIRBAS, 2009).

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do glicerol (BEATRIZ et al., 2011).

Fórmula química	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$
Massa molecular	$92,09382 \text{ g.mol}^{-1}$
Densidade	$1,261 \text{ g.cm}^{-3}$
Viscosidade	$1,5 \text{ Pa s}$
Ponto de fusão	$18,2 \text{ }^\circ\text{C}$
Ponto de ebulição	$290 \text{ }^\circ\text{C}$
Calorias	$4,32 \text{ Kcal.g}^{-1}$
Ponto de fulgor	$160 \text{ }^\circ\text{C}$
Tensão superficial	$64,00 \text{ mN.m}^{-1}$
Coefficiente de temperatura	$-0,0598 \text{ mN.(mK)}^{-1}$

Em escala comercial, o glicerol está disponível em três formas diferentes, glicerol bruto, glicerol purificado/refinado e o glicerol comercialmente sintetizado. O glicerol excedente de biodiesel não pode atender ao potencial do mercado em termos de pureza e custo à medida que o biocombustível está sendo produzido a partir de

substratos mais baratos (HU et al., 2012).

2.1.1 Utilização do glicerol

O glicerol é usado na fabricação de cosméticos, sabões, resinas, alimentos, bebidas, ésteres, polímeros e outros produtos (VIVEK, et al., 2017). Devido à natureza altamente redutora do glicerol, algumas biorrefinarias passaram a utilizar o glicerol bruto como matéria-prima em processos tecnológicos para produzir muitos produtos químicos, destacando-se a síntese de produtos de alto valor agregado (Figura 3) (DISHISHA et al. 2014, LIEBMINGER et al., 2014, CREMONEZ et al., 2015).

Através da reação de dismutação, pode-se produzir o 1,3-propanodiol que é aplicado na produção de polímeros e embalagens. (MITREA et al., 2018). O carbonato de glicerol é sintetizado pela transesterificação glicerol, e é utilizado como biolubrificante devido à sua aderência à superfícies metálicas e resistência à oxidação, hidrólise e pressão (MITREA et al., 2018). O 1,2 propanodiol, também conhecido como propilenoglicol é utilizado na indústria farmacêutica como solvente para preparações intravenosas, tópicas e orais (MITREA et al., 2018).

Por meio da reforma catalítica, pode-se produzir o gás hidrogênio empregado em muitas reações químicas. São exemplos, a obtenção do amoníaco para fertilizantes, o metanol, a hidrogenação do carvão e a soldadura (MITREA et al., 2018).

A diidroxiacetona é produto da reação de oxidação do glicerol e é amplamente utilizada como autobronzeador pela indústria de cosméticos (MITREA et al., 2018).

A acroleína é um importante intermediário químico em indústrias de vários setores. A oxidação da acroleína sob catalisadores à base de vanádio e molibdênio tem como produto principal o ácido acrílico que é utilizado na fabricação de polímeros, tintas e adesivos (KAMPE et al., 2007).

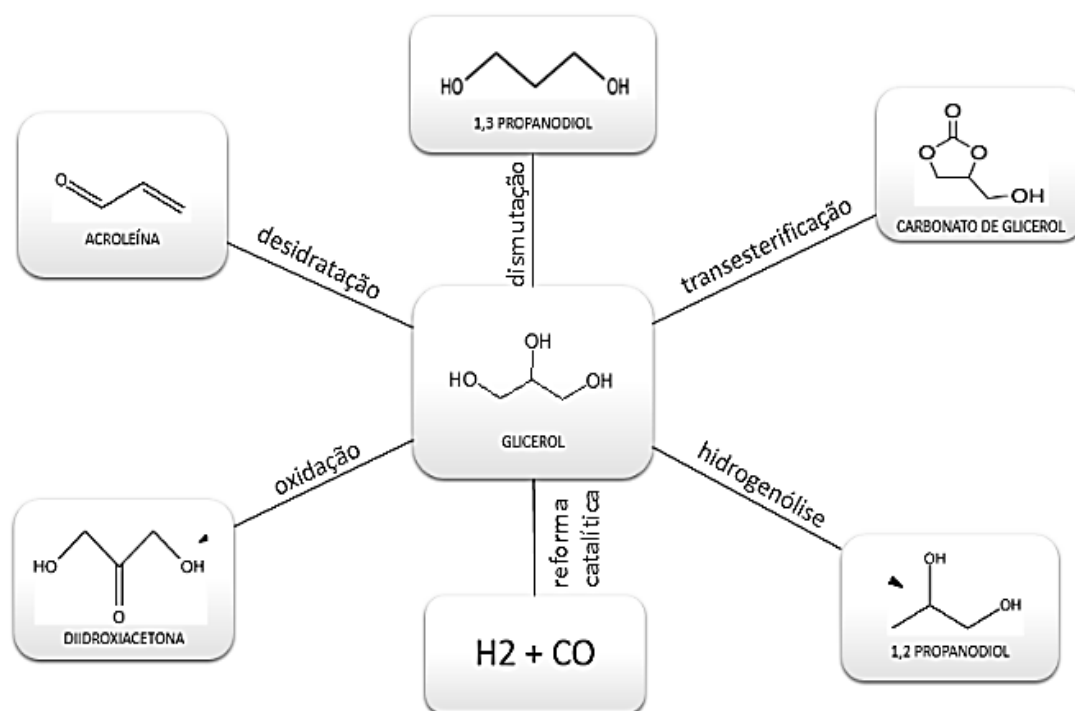


Figura 3. Produtos obtidos a partir do glicerol.

Em um levantamento recente, observamos que são escassos os artigos na literatura referentes à utilização do glicerol como fonte de carbono para produção de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) através da biotransformação realizada por fungos filamentosos. Essa carência de informações mostra o caráter inédito deste trabalho, mas ao mesmo tempo dificulta os diferentes aspectos dos ajustes metodológicos e bem como o entendimento teórico dos processos metabólicos envolvidos na biotransformação desejada (NAKAMURA et al., 2003; GARLAPATI et al., 2017).

Rivaldi et al. (2009) propõem que a utilização do glicerol em processos microbianos é de grande importância, visto que é um composto considerado fundamental dentro do sistema metabólico de microrganismos, atuando como precursor de numerosos compostos e como regulador de diversos mecanismos bioquímicos intracelulares.

Semelhante a várias outras moléculas pequenas e neutras, o glicerol consegue atravessar a membrana plasmática de diferentes microrganismos. Esta passagem ocorre através da difusão passiva (PAPANIKOLAOU et al., 2017; CHATZIFRAGKOU et al., 2011). Muitas cepas são capazes de se desenvolver utilizando o glicerol como fonte de carbono, devido ao fato deste substrato sofrer oxirredução no metabolismo por enzimas do tipo desidrogenases e desidratases (GARLAPATI et al., 2017).

Em eucariotos, o glicerol é transformado em intermediários da via glicolítica, através da fosforilação direta a glicerol-3-fosfato e subsequente desidrogenação, ou por via oxidativa com desidrogenação do glicerol e posterior fosforilação do produto da reação (MAKRI, FAKAS; AGGELIS, 2010). O produto destas reações é a diidroxiacetona-fosfato, que pode ser transformada em ácido cítrico, lipídios de armazenamento e diversos outros metabólitos. O principal problema para a utilização do glicerol bruto em cultivos microbianos é a grande quantidade de sais, oriundos da síntese de biodiesel via catálise básica, o qual pode inibir o crescimento microbiano e diminuir a formação de produtos (ZHU, CHEN; FANG, 2013).

O glicerol como precursor de lipídios em fungos, pode desempenhar um papel positivo no acúmulo dos mesmos. Papanikolaou et al. (2008) relatam que o aumento da concentração de glicerol no meio de crescimento aumentou, de alguma forma, o teor de ácidos graxos insaturados. A utilização de glicerol e estearina como co-substratos resultou em maior síntese de lipídios e aumento da produção de ácido cítrico do que a combinação de glicose e estearina. Resumidamente, os autores sugerem o glicerol, como única fonte de carbono no meio de crescimento, pode ter efeito positivo sobre o acúmulo de lipídios em fungos oleaginosos.

2.2 Microrganismos capazes de produzir e armazenar lipídios

Microrganismos que são capazes de produzir lipídios em nível superior a 20 % de sua biomassa são denominados oleaginosos. No caso das leveduras, dentre as mais de 1600 espécies conhecidas menos de 40 são consideradas oleaginosas (SITEPU et al., 2013). Os lipídios são necessários no metabolismo e na composição de estruturas celulares, por isso são produzidos por todos os microrganismos, normalmente na faixa de 6 a 8 %, principalmente como componentes da membrana celular. Entretanto, microrganismos oleaginosos, incluindo fungos filamentosos, leveduras, bactérias, e microalgas, são capazes de converter uma fonte de carbono, como por exemplo, o glicerol, quando disponível em excesso no meio de cultura, em triacilgliceróis intracelulares (TAG), logo que ocorre uma limitação de nitrogênio (RATLEDGE, 2002). Estes lipídios são armazenados na forma de gotículas no interior das células. Esses microrganismos capazes de sintetizar e armazenar lipídios, são particularmente atraentes para o desenvolvimento de abordagens biotecnológicas (BEOPOULOS, NICAUD; GAILLARDIN, 2011).

Vários fungos, especialmente cepas pertencentes ao gênero *Mortierella* spp. são conhecidos na literatura por produzirem elevada quantidade de ácidos graxos poli-insaturados. No entanto, o principal desafio na produção dos ácidos graxos poli-insaturados é a seleção de uma cepa que produza grande quantidade de biomassa e

apresente alto rendimento de ácidos graxos ω -3 e ω -6 como ácido linolênico e ácido linoleico respectivamente (LI et al., 2008). Embora já existam registros de cepas de microrganismos produtores de ácidos graxos poli-insaturados na literatura, há um grande interesse no uso da biodiversidade brasileira para o isolamento de microrganismos potenciais para este processo, pois o Brasil apresenta uma grande biodiversidade ainda pouco explorada em termos da avaliação/seleção de microrganismos para serem utilizados em processos biotecnológicos.

2.2.1 Síntese e armazenamento de lipídios em microrganismos

Os lipídios são considerados moléculas orgânicas compostas por átomos de hidrogênio, oxigênio e carbono. Possuem a característica de serem insolúveis em água e servem como componentes estruturais das membranas celulares, armazenamento de energia, pigmentos e sinais intracelulares (NELSON & COX, 2014).

Na fase inicial do crescimento, um fungo filamentoso precisa produzir fosfolipídios para a formação de novas membranas lipídicas, entretanto, na fase estacionária os fungos acumulam os lipídios na forma de triacilgliceróis ou ésteres. A transição de crescimento para o acúmulo de lipídios ocorre, em geral, quando o excesso de carbono no meio de cultura é associado a uma limitação de nutrientes que afetam a produção de biomassa. Além disso, durante a fase de armazenamento, precursores (acetil-CoA, malonil-CoA e glicerol) e energia (ATP, NADPH) são necessários para a síntese de lipídios (CZABANY et al., 2007).

O acúmulo de lipídios depende principalmente da fisiologia do microrganismo, da limitação de nutrientes e de outras condições ambientais e da relação C/N no meio de cultura (YKEMA et al., 1986). Assim, quando o microrganismo cresce, ele rapidamente esgota o suprimento de nitrogênio, mas continua a assimilar a fonte de carbono. Isto é canalizado diretamente para a síntese lipídica com o acúmulo resultante de triacilgliceróis dentro da célula como gotículas. Este acúmulo pode atingir mais de 70 % da biomassa celular em alguns microrganismos oleaginosos (GILL et al 1977; RATLEGDE, 1994).

A capacidade de um organismo para acumular grandes quantidades de lipídio pode ser resumida em:

- Produzir suprimento contínuo de acetil-CoA diretamente no citosol da célula como um precursor necessário para a síntese de ácidos graxos;
- Produzir um suprimento suficiente de NADPH como o redutor essencial usado

na biossíntese de ácidos graxos.

Para a produção de lipídios a partir do glicerol, esta molécula é convertida em glicerol-3-P e posteriormente em diidroxiacetona-P (DHAP) e seguindo a via metabólica da glicólise até a produção de acetil-CoA graxo. A síntese lipídica em fungos requer um fornecimento constante de acil-CoA e glicerol-3-P para a acilação do esqueleto de glicerol e posterior síntese de TAG's ou esterificação dos esteróis para produzir esteres de esterol (EE).

Os primeiros dois átomos de carbono para a síntese de ácidos graxos são fornecidos por acetil-CoA citosólico, através da clivagem do citrato (fornecido pelo ciclo do TCA) pela ATP-citrato-liase (ACL). Então acetil-CoA é convertido em malonil-CoA através da acil carboxilase (ACC1) (BEOPOULOS et al., 2009; WANG et al., 2013). A cadeia de ácidos graxos cresce através da adição de acetil-CoA a uma unidade de malonil-CoA formando acetoacetil-CoA. Em seguida, após várias reações envolvendo NADPH, ATP e a incorporação de mais moléculas de malonil-CoA (ciclo de alongamento), ocorre a formação de palmitato, que é o precursor de todos os outros ácidos graxos. Para cada etapa do alongamento da cadeia de ácido graxo, duas moléculas de NADPH são necessárias. Este NADPH é gerado principalmente pela enzima málica (EM) (FONTES et al., 2008; WANG et al., 2013).

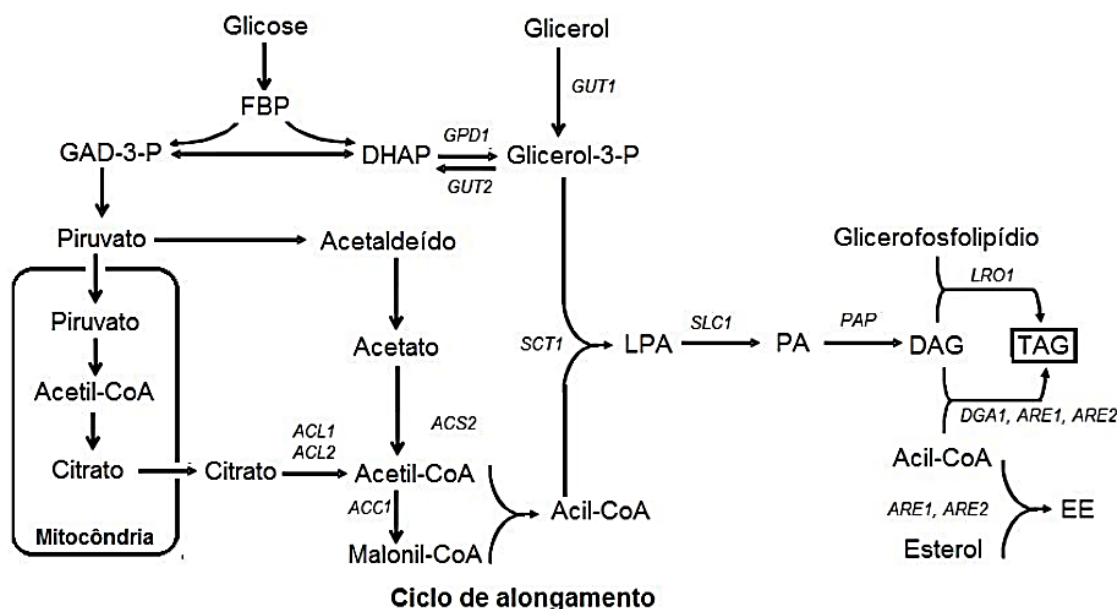


Figura 4. Síntese de lipídios neutros. O glicerol-3-P usado na síntese de TAG é formado a partir do glicerol que também é convertido em diidroxiacetona e metabolizado até a formação citrato. O acetil-CoA citosólico é obtido através da clivagem do citrato pela ATP-citrato-liase (ACL1 e ACL2). Acetil-CoA é convertido em malonil-CoA através da

acil carboxilase (ACC1) e a cadeia de ácidos graxos cresce através da adição de acetil-CoA a uma unidade de malonil-CoA seguida da incorporação de mais moléculas de malonil-CoA (ciclo de alongamento), obtendo assim o Acil-CoA. Na síntese de TAG três grupos acila são adicionados ao glicerol-3-P, onde primeiramente ocorre a acilação do glicerol-3-P na posição sn-1 para gerar acil glicerol-3-P (ácido lisofosfatídico; LPA), posteriormente LPA sofre mais uma acilação na posição sn-2 pela ácido lisofosfatídico aciltransferase (SLC1) para gerar ácido fosfatídico (PA). O PA é desfosforilado pela enzima fosfoidrolase fosfatídica ácida (PAP), obtendo diacilglicerol (DAG). Para a síntese final de TAG, DAG é acilada na posição sn-3, através de uma acil-CoA-dependente ou acil-CoA-independente. Na via de acil-CoA-dependente, o terceiro grupo acila é fornecido pela acil-CoA, enquanto que na acil-CoA-independente, é fornecido por um glicerofosfolipídio. A formação de ésteres de esterol (EE) envolve a reação de uma molécula de ácido graxo (Acil-CoA) com um grupo hidroxila de esteróis, essa reação é catalisada pelas enzimas ARE1 e ARE2 (SEIP, et al., 2013)

Em resumo, a síntese de TAG segue a via de Kennedy, onde três grupos acila são adicionados ao glicerol-3-P para gerar TAG. Este processo envolve quatro passos catalisados por enzimas:

- Primeiramente ocorre a acilação do glicerol-3-P na posição sn-1 para gerar acil glicerol-3-P (ácido lisofosfatídico, LPA)
- LPA sofre mais uma acilação na posição sn-2 pela ácido lisofosfatídico aciltransferase (SLC1) para gerar ácido fosfatídico (PA).
- PA é desfosforilado pela enzima fosfoidrolase fosfatídica ácida (PAP), obtendo diacilglicerol (DAG).
- Para a síntese final de TAG, DAG é acilada na posição sn-3, através de uma reação acil-CoA-dependente ou acil-CoA-independente. Na via acil-CoA independente, este terceiro grupo acila é fornecido por um glicerofosfolipídio (PL), enquanto que na via acil-CoA dependente é fornecido pela acil-CoA. A reação acil-CoA-dependente é catalisada por três enzimas: Dga1p, Are1p e Are2p.

Os lipídios produzidos por microrganismos são diferentes em composições e propriedades; alguns microrganismos oleaginosos podem acumular lipídeos rapidamente com composição de ácidos graxos semelhantes à de óleos vegetais. Além disso, a produção apresenta várias vantagens em relação ao óleo de vegetais, tais como ciclo de vida curto e não há necessidade de terrenos agrícolas para a sua produção (JINGYANG et al., 2012).

2.3 Ácidos Graxos Poli-insaturados (PUFAs)

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) são compostos por 18 ou mais carbonos, apresentando dois ou mais metilenos intercalados por uma ligação dupla. Dependendo da posição da primeira ligação dupla próxima ao grupo metil terminal do ácido graxo, os PUFAs podem ser designados por ômega (ω -) ou (n-) seguidos de números e classificados em 2 grupos majoritários: família do ω -6 (ou n-6) e ω -3 (n-3) (HOU, 2005).

Os organismos capazes de produzir PUFAs são plantas, alguns microrganismos (como fungos, leveduras, microalgas e bactérias). Animais superiores, sobretudo o ser humano, é incapaz de sintetizar os ácidos graxos poli-insaturados (ω -3 e ω -6) devido à falta de dessaturases e elongases, que são enzimas capazes de inserir duplas ligações a alongar a cadeia dos ácidos graxos (Figura 5). No entanto, os mamíferos podem metabolizar estes dois ácidos graxos, considerados essenciais, obtidos da dieta alimentar para formar outros ácidos graxos poli-insaturados e mais longos para necessidades metabólicas (LEE et al., 2016).

Em mamíferos, os ácidos graxos poli-insaturados têm uma importante função estrutural, modulando a fluidez e a permeabilidade da membrana. Estes ácidos servem ainda como precursores de inúmeras moléculas biologicamente ativas, como eicosanóides, reguladores de crescimento e hormônios. Em mamíferos, os eicosanóides, assim como os leucotrienos e tromboxanos, agem localmente em diversos mecanismos sinalizadores que têm efeitos em funções celulares induzindo quimiotaxia, permeabilidade vascular, inflamação, vasoconstrição entre outros. Ácidos graxos são importantes mensageiros no processo de sinalização celular e também fazem parte da composição dos fosfolípidios que constituem a membrana plasmática. A estrutura geral da maioria dos ácidos graxos naturais é de um ácido carboxílico com uma cadeia alifática não ramificada formada por hidrocarbonetos. Esses ácidos graxos podem ser classificados de acordo com o número de duplas ligações entre os carbonos da cadeia (NELSON & COX, 2014).

Os ácidos graxos saturados (SFA), como o ácido esteárico, não possuem ligações duplas. Os ácidos graxos monoinsaturados (MUFA), como o ácido oleico, tem uma ligação dupla. Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), como ácido linoleico, ácido araquidônico (AA) e ácido docosa-hexaenóico (DHA) têm duas ou mais ligações duplas.

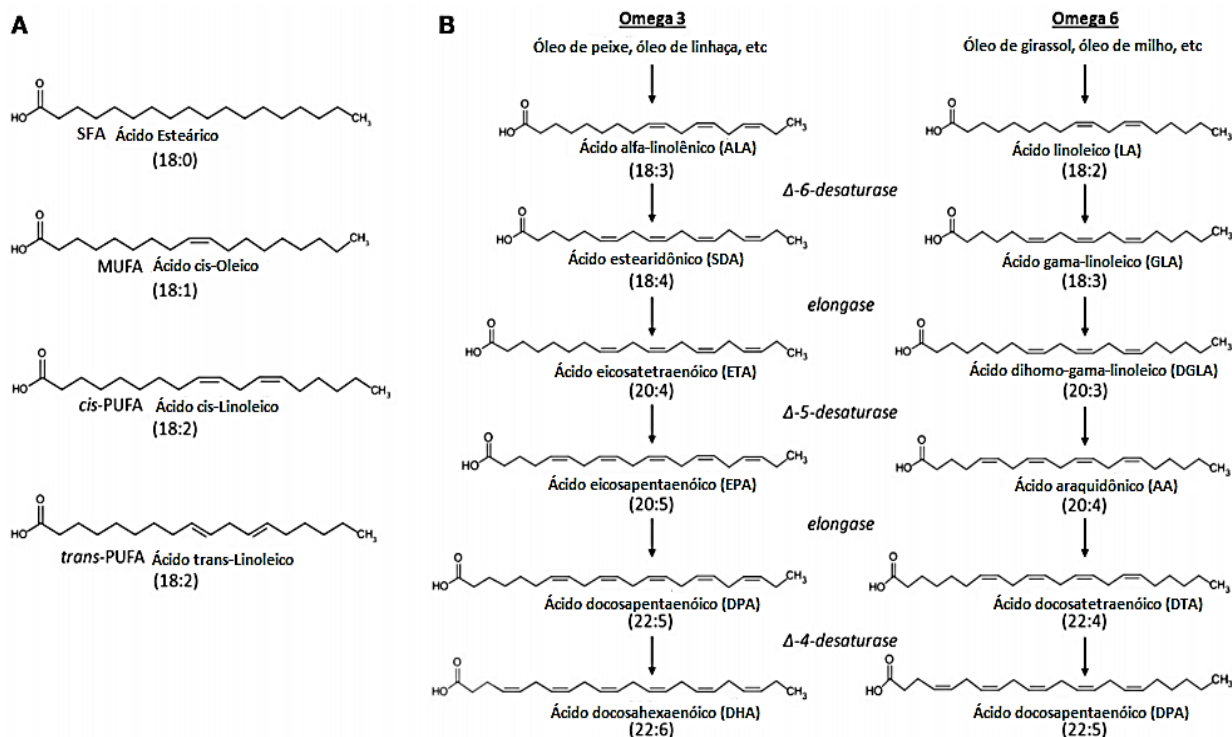


Figura 5. Os ácidos graxos não esterificados são classificados de acordo com a presença, número e geometria de duplas ligações (A). Abreviaturas: MUFA, ácido graxo monoinsaturado; SFA, ácido graxo saturado; PUFA, ácido graxo poli-insaturado; O PUFA é mostrado nas configurações *cis* como em *trans* (B) Caminhos metabólicos da síntese de ácidos graxos ω -3 e ω -6. O ácido alfa-linolênico e o ácido linoleico são os precursores de PUFAs n-3 e 6, respectivamente. Diferentes enzimas atuam (dessaturases e elongases) convertem esses precursores em diferentes PUFAs de cadeia longa FONTE:(ELINDERF;LIIN, 2017, Adaptado pelo autor).

2.3.1 Importância dos PUFAs

A baixa ingestão de PUFAs na maior parte do mundo aumenta o risco de doenças em humanos (SAINI et al, 2018). Câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade e osteoporose são principais doenças crônicas relacionadas à dieta e sedentarismo. Entre as fontes alimentares, os lipídios desempenham papéis críticos na prevenção e ocorrência de todas estas doenças. (BERQUIN et al, 2008; FREDMAN & TABAS, 2017).

Várias estratégias foram propostas para aumentar o consumo de PUFAs, incluindo:

- Aumento do consumo de peixes marinhos e outros alimentos ricos em PUFAs;

- Enriquecimento de alimentos com produtos ricos em PUFA, como óleo de peixe, óleos vegetais e castanhas oleaginosas (SAINI, et al 2018);
- Melhoria nos níveis de PUFA em produtos de origem animal através do aumento da ingestão de PUFA na dieta desses animais (MOGHADASIAN, 2008);
- Aumento da quantidade de PUFA em plantas oleaginosas por engenharia genética (GARG, 2006).

O peixe é a principal fonte de PUFA, e tem sido amplamente utilizado na indústria de alimentos em conjunto com os óleos vegetais para obter concentrados de PUFA (RUBIO-RODRÍGUEZ et al, 2010).

O consumo mundial de peixe tem crescido, e segundo a FAO, em 2016 atingiu o recorde de 20 kg por pessoa/ano. No entanto, a disputa de mercado do pescado entre o consumo e a suplementação dietética, aumenta substancialmente o preço do peixe e encarece os produtos derivados. Outra desvantagem, é que a grande maioria da produção de pescado explora os recursos naturais marinhos, e com o aumento dessa demanda, os níveis podem ficar insustentáveis.

A produção de PUFA por métodos alternativos, como a biotransformação mediada por fungos filamentosos, pode ser uma das alternativas para suprir a demanda desses ácidos graxos destinados à suplementação dietética.

Os fungos são organismos extremamente importantes. Eles são utilizados na produção de alimentos como os produtos fermentados e bebidas alcoólicas, contribuem na indústria farmacêutica, estão presentes no processo de biodegradação e tratamento biológico de efluentes, atuam na atividade enzimática, ou seja, na produção de enzimas de interesse industrial e na biotransformação (MCNEIL, 2013)

Estudos sobre fungos, principalmente os endofíticos são necessários para fornecer informações fundamentais sobre a avaliação da biodiversidade, distribuição global desses microrganismos, seu alto poder de resistência às condições extremas, capacidade de adaptação, bem como a produção de compostos de interesse industrial, sendo essas características alvos de crescente interesse como ferramentas para aplicação nos processos de biodegradação, biorremediação e biotransformação (STONE et al., 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Realizar um estudo de bioprospecção com a finalidade de selecionar fungos endofíticos isolados de raízes e folhas de *Aspilia grazielae* (Santos) e de duas espécies de fungos filamentosos isolados de solo, para obtenção de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) através do aproveitamento do glicerol. Utilizar as cepas selecionadas na produção de ácidos graxos poli-insaturados *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos:

- Testar a capacidade de 51 cepas de fungos endofíticos filamentosos isolados de folhas e raízes de *Aspilia grazeleae* (Santos) e das espécies *Penicillium solitum* e *Sarocladium strictum*, isoladas de solo, de crescer em meio de cultura sólido contendo óleo vegetal e glicerol como fonte de carbono;
- Utilizar cepas selecionadas para produzir ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), através de ensaios de biotransformação;
- Definir as condições ótimas de produção de PUFAs, tais como, concentração do substrato, temperatura, pH, composições mínimas do meio de cultura líquido para a biotransformação, entre outros;
- Identificar, analisar e quantificar os PUFAs, por experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Infra-Vermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/MS).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Biológico

Foram utilizadas 51 cepas de fungos endofíticos isolados de raízes e folhas de *Aspilia grazielae* (Santos), uma espécie endêmica do Pantanal. O material vegetal foi coletado no Morro do Urucum, Corumbá Brasil, em dezembro de 2016. As cepas foram isoladas pelo doutorando Carlos Eduardo Weirich e gentilmente cedidas para a realização deste trabalho. Após análise morfológica, as cepas foram assim classificadas:

- 18 *Aspergillus* spp.
- 13 *Colletotrichum* spp.
- 10 *Penicillium* spp.
- 10 *Fusarium* spp.

Também foram utilizadas as espécies *Penicillium solitum* e *Sarocladium strictum* ambos isolados de amostras de solo, depositadas na Micoteca do Instituto de Biociências da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e cedidas pela Profa. Dra. Giovana Giannesi.

4.2 Glicerol

O glicerol da marca QHEMIS® foi utilizado em todos os experimentos neste trabalho e apresenta as especificações mostradas abaixo:

Tabela 2. Características Físico-químicas do glicerol utilizado neste trabalho.

Especificações glicerol	
Aparência	Líquido Incolor
Odor	Inodoro
Pureza mínima	100 %
Cloretos	Máximo de 10 ppm
Metais pesados (Pb)	Máximo de 5 ppm
Densidade 25 °C	Mínimo 1,249 g/cm ³
Compostos Cloratos	Máximo de 30 ppm
pH (sol. de 10% de água)	6 à 8
Cor (Alpha)	Máximo 10
Água	0,05 %

4.3 Pré-seleção dos fungos

4.3.1 Atividade lipolítica

A avaliação da atividade lipolítica dos fungos isolados foi realizada utilizando-se o Meio M, segundo WATANABE et al (1977), com modificações, no qual se utilizou tampão tris-HCl 0,1M, azeite de oliva a 2 %, 0,25 % de fosfato dipotássico (K_2HPO_4), 0,13 % de uréia ($(NH_2)_2CO$), 0,13 % de sulfato de amônio ($(NH_4)SO_4$), 0,05 % de sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 0,05 % de extrato de levedura, 0,75 % de carbonato de sódio (Na_2CO_3), 0,25% de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) e ágar bacteriológico. A mistura foi aquecida, emulsificada e o pH ajustado para 8,9. O meio foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121 °C. Antes do plaqueamento foi adicionado o corante oxazínico azul vitória B para indicar a lipólise pelos microrganismos.

4.3.2 Meio de cultura GSB (Glicerol, Sais e Biotina)

A seleção dos fungos com potencial para metabolização de glicerol como única fonte de carbono foi realizada de acordo com NAVARRO (1996), com modificações. Para o preparo do meio se utilizou 0,49 g/L fosfato dipotássio (K_2HPO_4), 1,74 g/L fosfato monopotássico (KH_2PO_4), 0,21 g/L ácido cítrico mono hidratado, 2,54 g/L cloreto de magnésio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6 H_2O$), 1,63 g/L sulfato de sódio (Na_2SO_4), 7,00 mg/L sulfato de zinco heptahidratado $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, biotina 4,0 µg/L, glicerol 20 g/L e ágar bacteriológico 15 g/L. Os reagentes foram solubilizados em água destilada e o pH ajustado para 6,5. O meio foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121 °C.

4.4 Preparo do inóculo

Os fungos isolados selecionados para a biotransformação com o glicerol foram mantidos em meio de cultura BDA. Porções do micélio de cada fungo foram retiradas com auxílio de agulha de níquel-cromo devidamente esterilizada em chama, e utilizadas para inoculação pontual nos meios em placa de Petri. Após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa BOD a 30 °C por 7 dias.

4.5 Ensaio de biotransformação

Para os ensaios de biotransformação, foi preparado um meio de cultura líquido conforme descrito na literatura (MARQUES, 1998; CANTORAL et al., 1987; MELIN et al., 2008; REYES-DOMINGUEZ et al., 2012; OMOIFO, 2011).

Utilizou-se para o preparo do meio de cultura: 2,00 g/L de D-glucose, 0,20 g/L de asparagina, 0,20 g/L de KH_2PO_4 , 0,025 de $MgSO_4$, 0,05 g de tiamina. Os reagentes

foram dissolvidos em água destilada e o pH ajustado para 6,0. Os meios foram vertidos em frascos de Erlenmeyer (alíquotas de 100 mL) e autoclavados.

Os meios foram inoculados com os fungos selecionados pela retirada de 5 fragmentos de 0,2 cm do meio de cultura sólido contendo o fungo com a auxílio de uma alça bacteriológica devidamente esterilizada em bico de Bunsen. Após a inoculação o meio líquido foi mantido em incubadora a 25 °C com agitação a 150 rpm na ausência de luz como descrito na Figura 6. Durante um período de 48 horas, foi realizada a fase de adaptação fungo ao meio de cultura.

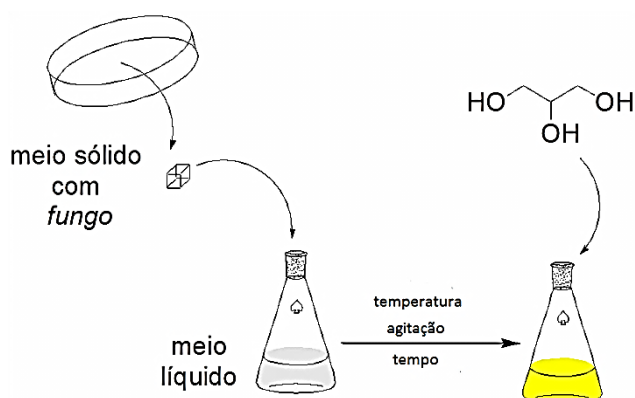


Figura 6. Representação esquemática do ensaio de biotransformação. FONTE: (ITO, 2007).

Em seguida, foram adicionados 10g de glicerol, cujo pH foi ajustado entre 6-7 e previamente esterilizado em autoclave (ITO et al. 2009). O meio foi novamente mantido em incubadora a 25 °C com agitação a 150 rpm na ausência de luz por 6 dias para a formação de micélios e a biotransformação do glicerol. Durante um período de 6 dias (144 horas) do ensaio de biotransformação, foram retiradas alíquotas em intervalos de 24 horas para o monitoramento de pH. Como controles foram utilizados: apenas meio de cultura, meio de cultura e substrato e meio de cultura e fungo (ITO, 2007).

4.6 Extração de compostos

Transcorrido o período de seis dias, os meios de cultura foram filtrados à vácuo em funil de vidro sinterizado para a separação da fase aquosa (meio de cultura líquido) dos micélios produzidos pelos fungos.

Neste trabalho foram utilizados dois tipos de extração: (1) o método Bligh & Dyer (1959) para extração lipídica e (2) extração líquido-líquido com o solvente orgânico acetato de etila para outros compostos orgânicos que se formaram na biotransformação.

4.6.1 Extração de lipídios pelo método de Bligh & Dyer

A mistura clorofórmio:metanol (2:1 v/v) tem sido amplamente utilizada na literatura para extração de lipídeos de diferentes matérias-primas. Este método de extração, desenvolvido por Bligh & Dyer (1959) utiliza os micélios produzidos durante a biotransformação. As amostras de micélios foram maceradas em graal com pistilo, com a finalidade de aumentar a superfície de contato com o solvente.

Em um Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 100 mL da mistura clorofórmio:metanol (2:1) juntamente com os micélios. As extrações foram realizadas utilizando mesa agitadora por 30 minutos a 150 rpm. Após esse período, a mistura foi separada em funil de decantação. A fase orgânica obtida no processo foi concentrada em evaporador rotativo a 45 °C sendo o solvente orgânico recuperado.

4.6.2 Extração líquido- líquido com acetato de etila

Na fase aquosa recuperada no processo de filtração foi realizada a extração líquido-líquido com o solvente orgânico acetato de etila.

Em um Erlenmyer de 250 mL foi adicionada a fase aquosa e 50 mL de acetato de etila para a extração dos compostos produzidos no ensaio de biotransformação. A mistura foi colocada em mesa agitadora por 5 minutos e após esse período, a mistura foi separada em funil de decantação, sendo a fase aquosa novamente recuperada e submetida ao processo de extração por mais duas vezes antes de ser descartada. A fase orgânica obtida no processo foi concentrada em evaporador rotativo a 45 °C, sendo o solvente orgânico recuperado.

4.7 Purificação dos compostos

Os compostos obtidos no processo de biotransformação após a extração com solventes orgânicos foram purificados por cromatografia de camada delgada preparativa (CCD) utilizando-se sílica preparativa (SiO₂) como fase estacionária.

Como eluente foram utilizadas misturas dos solventes acetato de etila/hexano/ácido acético 8,5:1:0,5 para os compostos obtidos na extração líquido-líquido e a mistura dos solventes clorofórmio/metanol/ácido acético 7:2:1 para os compostos obtidos pela extração de lipídios segundo Bligh&Dyer.

4.8 Métodos para determinação dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs)

4.8.1 Análise de IV-TF

Medidas de absorção na região do infravermelho foram realizadas em um espectrofotômetro modelo 4100 (JASCO), equipado com um acessório de refletância total atenuada com cristal de Seleneto de Zinco (ZnSe). Os espectros de absorção foram obtidos na faixa entre 400 e 4000 cm^{-1} , a temperatura ambiente. A resolução de 2 cm^{-1} e 64 varreduras foi adotada em todas as medições a fim de se verificar a presença de ácidos graxos poli-insaturados no extrato lipídico obtido após a biotransformação do glicerol pelos fungos isolados.

4.8.2 Análise de RMN de ^1H

No experimento de ressonância magnética nuclear (RMN) cerca de 10 mg das amostras obtidas pela biotransformação do glicerol foram solubilizados em clorofórmio deuterado (CDCl_3) até volume total da solução de 500 μL . Medições de RMN unidimensional (1D) foram realizada em espectrômetro Bruker DPX 300 (7,05 T). Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos com 128 varreduras (NS), 64 k pontos (TD), 6,84 s de aquisição (AQ) e tempo de espera de 1 s (d1). Todos os espectros foram processados com a utilização de multiplicação exponencial (^1H , 0,30 Hz) e correções manuais de fase e de linha de base.

4.8.3 Derivatização e Análise em CG/MS

Para a derivatização, foi utilizado cerca de 100 a 150 mg de lipídios sintetizados pelos fungos. Adicionou-se 5,0 mL de solução aquosa de NaOH a 0,5 M e 1 mL de metanol, sendo essa mistura aquecida sob refluxo durante 5 min. Após esse processo, foi adicionado 15 mL do reagente de esterificação (preparado a partir de uma mistura de 2 g de cloreto de amônio, 60 mL de metanol e 3 mL de ácido sulfúrico concentrado), a mistura foi aquecida sob refluxo durante mais 3 min. e transferiu-se para um funil de separação juntamente com 25 mL de éter de petróleo e 50 mL de água deionizada. Após a agitação e a separação de fases, a fase orgânica foi lavada mais duas vezes com 25 mL de água deionizada. A fase orgânica foi recolhida e o solvente foi evaporado em rotaevaporador Os ésteres metílicos foram solubilizados em metanol grau HPLC antes da injeção no cromatógrafo de gás (MILINSK et al., 2011; HARTMAN & LAGO, 1973 adaptado).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Pré-seleção da atividade lipolítica

Os 51 isolados de *Aspilia grazielae* foram submetidos à pré-seleção através da avaliação da atividade lipolítica. Os resultados do crescimento em meio de cultura dos fungos mais promissores estão sumarizados na Tabela 3, e foram obtidos pela medida do raio do desenvolvimento da colônia e do halo lipolítico, que indica a atividade enzimática (Figura 7).

Tabela 3. Tamanho da colônia e halo de lipólise em função do tempo de incubação.

Tempo de incubação	Identificação do fungo	Raio (mm)		R/r
		Colônia (r)	Halo lipolítico (R)	
24 horas	<i>Fusarium</i> spp. (GF14)**	5,9	8,8	1,49
	<i>Fusarium</i> spp. (GF11)**	4,1	6,4	1,56
	<i>Colletotrichum</i> spp. (405)	3,5	4,1	1,17
	<i>Fusarium</i> spp. (HR8B)**	3,4	5,1	1,50
	<i>Colletotrichum</i> spp. (5)	3,3	3,5	1,06
	<i>Colletotrichum</i> spp. (301)	3	3,2	1,07
48 horas	<i>Fusarium</i> spp. (GF14)**	8,5	10,4	1,22
	<i>Fusarium</i> spp. (GF11)**	5	7,5	1,50
	<i>Colletotrichum</i> spp. (405)	4,3	5,1	1,19
	<i>Fusarium</i> spp. (HR8B)**	4,2	5,4	1,29
	<i>Colletotrichum</i> spp. (5)	4,1	4,4	1,07
	<i>Colletotrichum</i> spp. (301)	3,9	4,2	1,08
72 horas	<i>Fusarium</i> spp. (GF14)**	9,6	11,7	1,22
	<i>Fusarium</i> spp. (GF11)**	5,9	8,1	1,37
	<i>Colletotrichum</i> spp. (405)	5	5,8	1,16
	<i>Fusarium</i> spp. (HR8B)**	4,9	5,3	1,08
	<i>Colletotrichum</i> spp. (5)	4,5	4,8	1,07
	<i>Colletotrichum</i> spp. (301)	4,4	4,5	1,02

** Isolados fúngicos que apresentaram relação $R/r > 1,2$

Em estudo realizado por Colen et al. (2005), os autores utilizaram a relação R/r maior do que 1,2 em pelo menos um dos períodos de incubação observados, para considerar os fungos mais promissores, em termos de atividade lipolítica. Em nosso trabalho, dos 51 fungos isolados utilizados, 6 (11,8 %) apresentaram crescimento e halo lipolítico no meio de cultura. Entretanto, de acordo como a relação $R/r > 1,2$,

apenas as cepas GF14, GF11 e HR8B, (5,9 %) todas pertencentes ao gênero *Fusarium* apresentaram maior potencial de atividade lipolítica.

Com o aumento do tempo de incubação, foi possível perceber que os fungos apresentaram uma diminuição relativa do halo de lipólise, provavelmente devido ao fato da taxa de crescimento radial das colônias ser maior do que a taxa de difusão da enzima no meio de cultura.

O efeito do corante azul vitória B adicionado ao meio de cultura M foi constatado através da formação de halos azuis, como demonstrado na Figura 7. Esse fenômeno acontece por meio da lipólise, que libera os ácidos graxos presentes do óleo de oliva e provocam a diminuição do pH, ficando mais intensa com o aumento da concentração de ácidos graxos livres (THOMSON, et al. 1999).

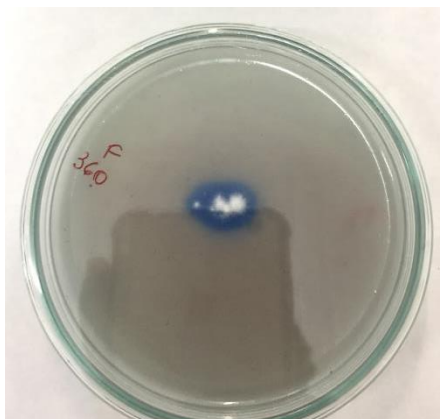


Figura 7. Ensaio de atividade lipolítica após 24h com o isolado *Fusarium* spp. (360). É possível detectar o halo lipolítico em azul e o crescimento radial do fungo.

5.2 Crescimento no meio GSB

As 51 cepas isoladas de *A. graziellae* foram testadas em meio de cultura contendo apenas o glicerol como fonte de carbono, com a finalidade de avaliar a capacidade de utilização deste substrato. O preparo do meio de cultura e a inoculação foram realizados como descrito no item Material e Métodos.

Como parâmetro para considerar os fungos com maior potencial para assimilação do glicerol, foi observado o crescimento radial no meio de cultura, medido através do diâmetro da colônia após 72 horas de inoculação. A Tabela 4 apresenta os resultados das medidas realizadas.

Tabela 4. Crescimento radial em meio de cultura GSB.

Gênero	Código da cepa	Diâmetro Crescimento radial em placa após 72 horas (mm)
<i>Penicillium</i> spp	DR11	12
<i>Penicillium</i> spp	CR16	25
<i>Penicillium</i> spp	IR6	30
<i>Penicillium</i> spp	DR2	21
<i>Penicillium</i> spp	BR3A	18
<i>Penicillium</i> spp	AF15	28
<i>Penicillium</i> spp	AR17	45*
<i>Penicillium</i> spp	BR4	10
<i>Penicillium</i> spp	BR10	47*
<i>Penicillium</i> spp	CR9	18
<i>Penicillium solitum</i>	1	53*
<i>Aspergillus</i> spp	AR6A	ND
<i>Aspergillus</i> spp	AR3	23
<i>Aspergillus</i> spp	FF5	56*
<i>Aspergillus</i> spp	FF3	41*
<i>Aspergillus</i> spp	LF10	21
<i>Aspergillus</i> spp	KR6	34
<i>Aspergillus</i> spp	MF16	38
<i>Aspergillus</i> spp	MF9	19
<i>Aspergillus</i> spp	LF1	37
<i>Aspergillus</i> spp	LF12	23
<i>Aspergillus</i> spp	MF6	ND
<i>Aspergillus</i> spp	LF13	36
<i>Aspergillus</i> spp	PR12	35
<i>Aspergillus</i> spp	QR4	28
<i>Aspergillus</i> spp	PR2	ND
<i>Aspergillus</i> spp	OF3	31
<i>Aspergillus</i> spp	MF5	27
<i>Aspergillus</i> spp	TR3(1)	31
<i>Fusarium</i> spp	GF14	18
<i>Fusarium</i> spp	GF11	24
<i>Fusarium</i> spp	IR8	31*
<i>Fusarium</i> spp	HR8B	28
<i>Fusarium</i> spp	KR7	ND
<i>Fusarium</i> spp	KR1	37*
<i>Fusarium</i> spp	LR2	12
<i>Fusarium</i> spp	LR1	23
<i>Fusarium</i> spp	OR10	29
<i>Fusarium</i> spp	OR8	26
<i>Colletotrichum</i> spp	BF21BA	26*
<i>Colletotrichum</i> spp	BF19BB	31*
<i>Colletotrichum</i> spp	AF4A	25
<i>Colletotrichum</i> spp	IF23	ND
<i>Colletotrichum</i> spp	135	18
<i>Colletotrichum</i> spp	188	19
<i>Colletotrichum</i> spp	301	11
<i>Colletotrichum</i> spp	237	16
<i>Colletotrichum</i> spp	214	24
<i>Colletotrichum</i> spp	398	21
<i>Colletotrichum</i> spp	405	23
<i>Colletotrichum</i> spp	460	19
<i>Colletotrichum</i> spp	525	23
<i>Sarocladium strictum</i>	3A	36*

*Fungos que apresentaram maior crescimento radial entre os gêneros testados. ND: representam os fungos que não cresceram neste meio de cultura.

Segundo Rivaldi et al., (2007) o glicerol é uma fonte de carbono altamente redutora e assimilada por vários microrganismos (bactérias, fungos e leveduras) para

obtenção de energia metabólica e compostos intermediários. No teste de seleção para crescimento no meio GSB, onde o glicerol foi a única fonte de carbono disponível, constatou-se que a maioria dos fungos utilizou o glicerol como fonte de carbono e cresceram nestas condições (Tabela 4, Figura 8) . Das 51 cepas testadas, apenas 5 (9,8 %) não apresentaram crescimento. Os fungos *Penicillium solitum* e *Sarocladium strictum* também cresceram no meio de cultura GSB.



Figura 8. B Cepa de *Colletotrichum* spp (BF19BA). Cultivado em meio GSB após 72 horas

Para os ensaios de biotransformação, foram utilizadas as cepas de cada gênero estudadas nesse trabalho que demonstraram maior crescimento radial evidenciado pela medição do diâmetro da colônia formada, conforme resultados demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5. Fungos escolhidos para o ensaio de biotransformação.

Gênero	Código da cepa	Diâmetro crescimento radial em placa após 72 horas (mm)
<i>Penicillium</i> spp.	BR10	47
<i>Penicillium</i> spp.	AR17	45
<i>Aspergillus</i> spp.	FF5	56
<i>Aspergillus</i> spp.	FF3	41
<i>Fusarium</i> spp.	KR1	37
<i>Fusarium</i> spp.	IR8	38
<i>Colletotrichum</i> spp.	BF19BA	26
<i>Colletotrichum</i> spp.	BF19BB	31

Além das cepas isoladas de *A.grazielae*, os fungos *Penicillium solitum* e *Sarocladium strictum* também foram utilizados nos ensaios de biotransformação.

5.3 Biotransformação

Os ensaios de biotransformação foram realizados com as cepas descritas na Tabela 5. Os gráficos a seguir demonstram o monitoramento de pH no meio de cultura líquido.

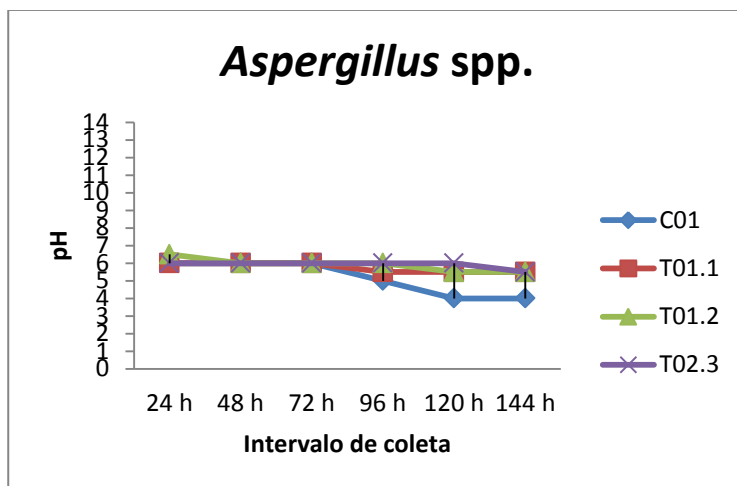


Figura 9. Monitoramento de pH em função do tempo. Amostras C01 controle (fungo+meio de cultura); triplicatas T01.1, T01.2 e T01.3 (fungo+meio de cultura+glicerol).

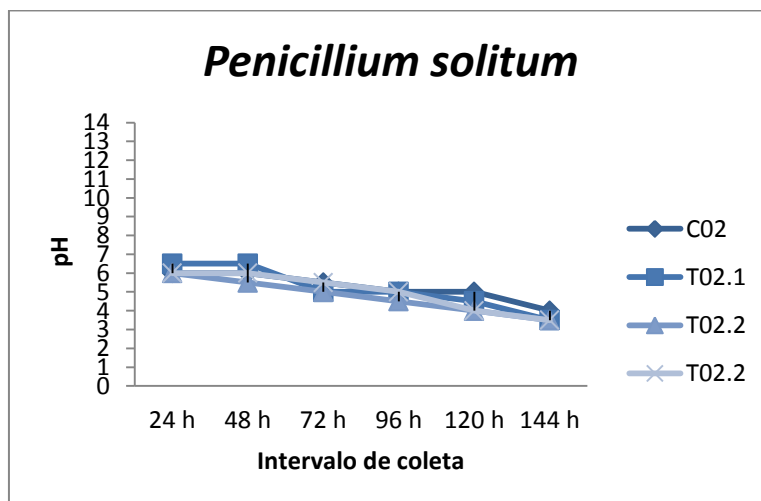


Figura 10. Monitoramento de pH em função do tempo. Amostras C02 controle (fungo+meio de cultura); Triplicatas T02.1, T02.2 e T02.3 (fungo+meio de cultura+glicerol).

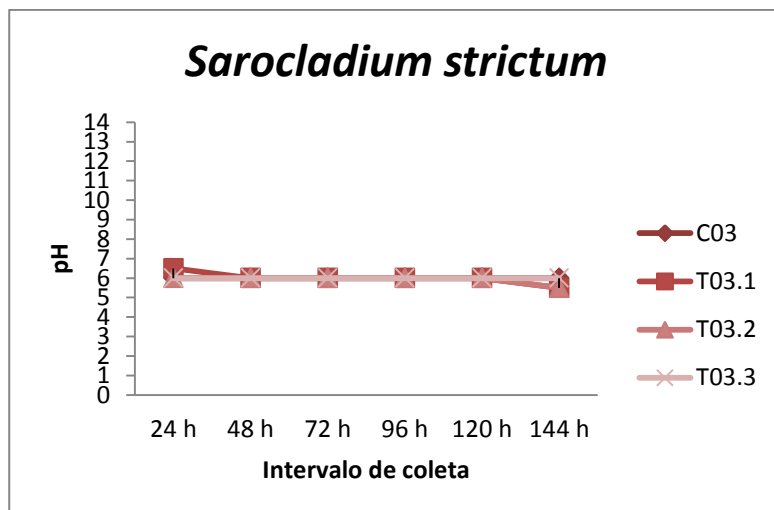


Figura 11. Monitoramento de pH em função do tempo. Amostras C03 controle (fungo+meio de cultura); Triplicatas T03.1, T03.2 e T03.3 (fungo+meio de cultura+glicerol).

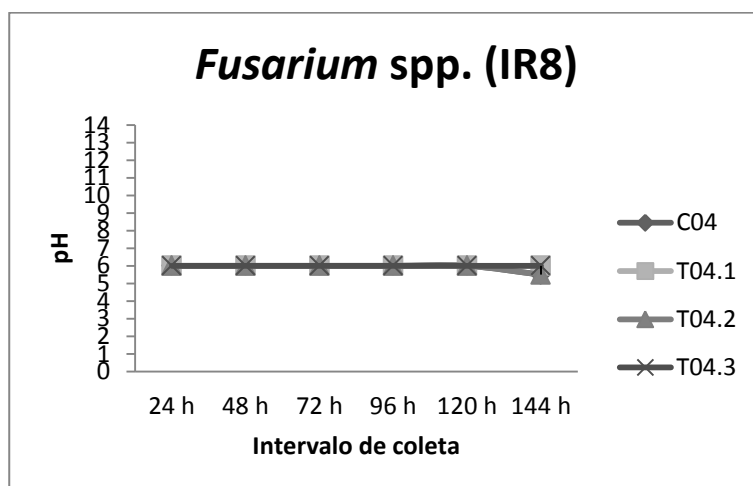


Figura 12. Monitoramento de pH em função do tempo. Amostras C04 controle (fungo+meio de cultura); Triplicatas T04.1, T04.2 e T04.3 (fungo+meio de cultura+glicerol).

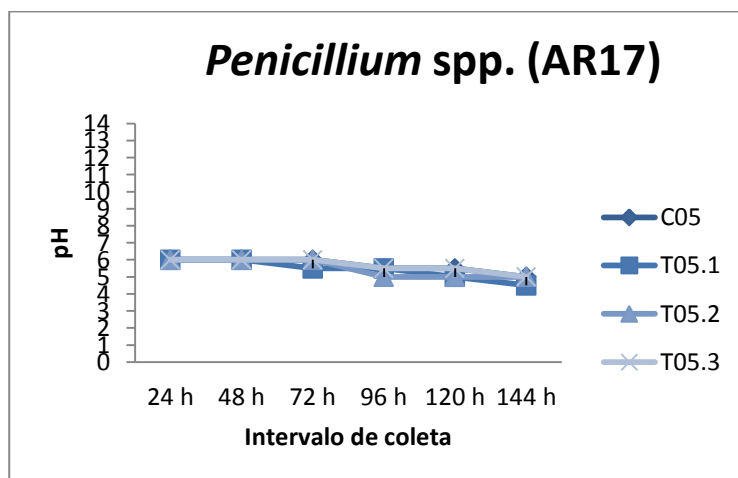


Figura 13. Monitoramento de pH em função do tempo. Amostras C05 controle (fungo+meio de cultura); Triplicatas T05.1, T05.2 e T05.3 (fungo+meio de cultura+glicerol).

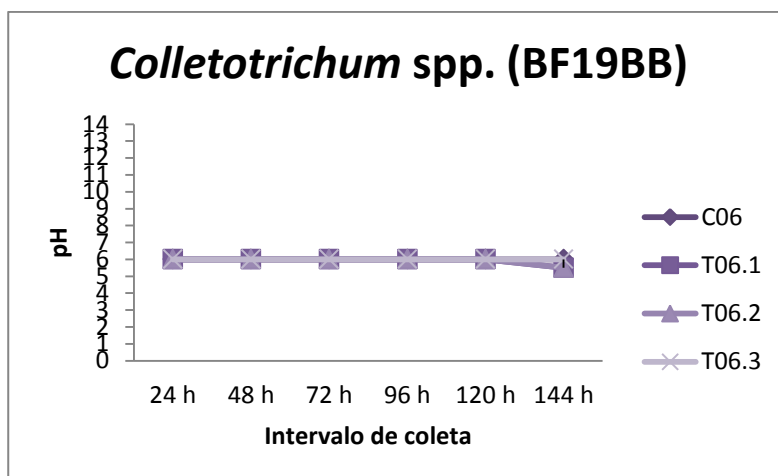


Figura 14. Monitoramento de pH em função do tempo. Amostras C06 controle (fungo+meio de cultura); Triplicatas T04.1, T04.2 e T04.3 (fungo+meio de cultura+glicerol).

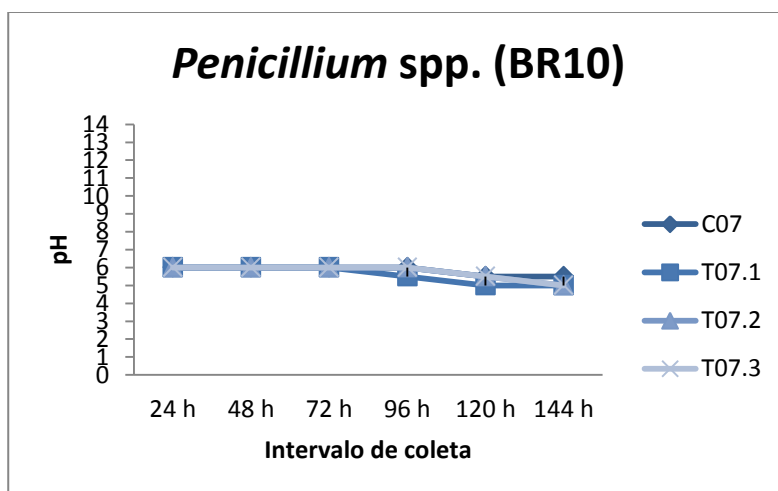


Figura 15. Monitoramento de pH em função do tempo. Amostras C07 controle (fungo+meio de cultura); Triplicatas T07.1, T07.2 e T07.3 (fungo+meio de cultura+glicerol).

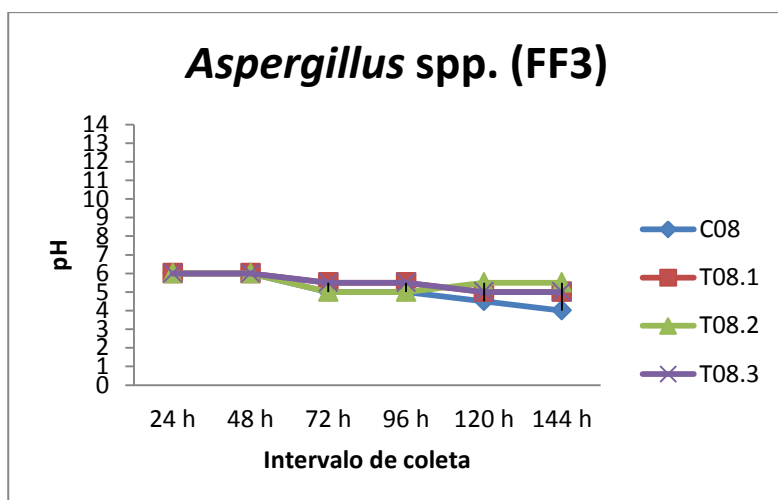


Figura 16. Monitoramento de pH em função do tempo. Amostras C08 controle (fungo+meio de cultura); Triplicatas T08.1, T08.2 e T08.3 (fungo+meio de cultura+glicerol).

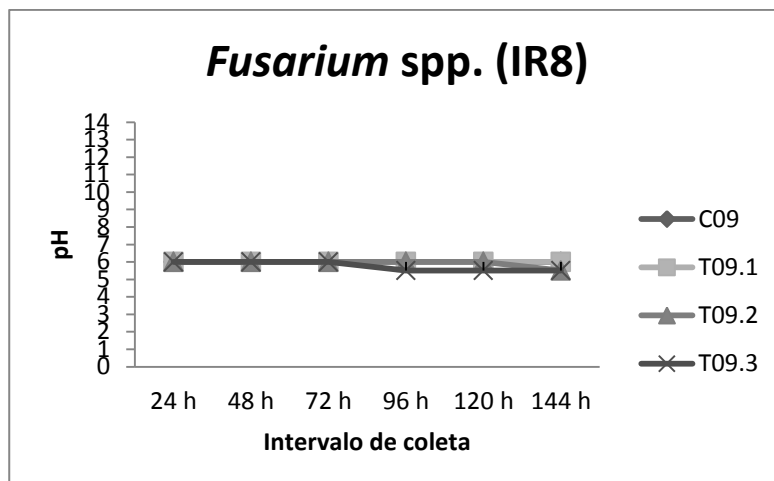


Figura 17. Monitoramento de pH em função do tempo. Amostras C09 controle (fungo+meio de cultura); Triplicatas T09.1, T09.2 e T09.3 (fungo+meio de cultura+glicerol).

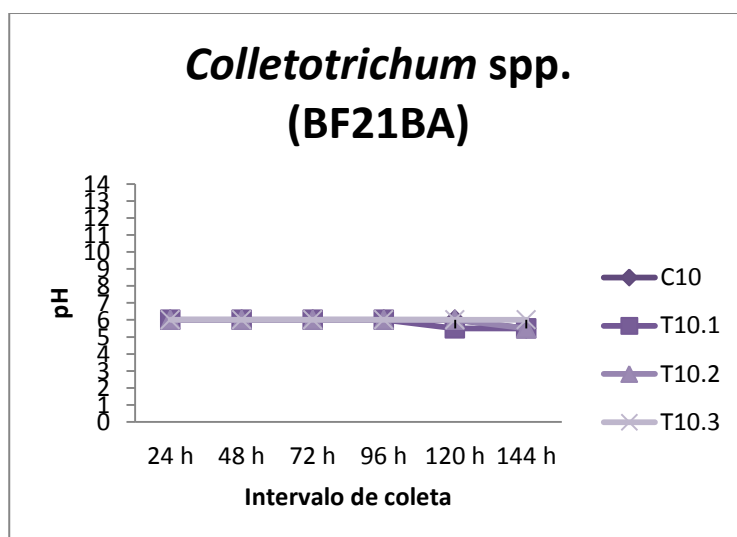


Figura 18. Monitoramento de pH em função do tempo. Amostras C10 controle (fungo+meio de cultura); Triplicatas T10.1, T10.2 e T10.3 (fungo+meio de cultura+glicerol).

Comparando-se os gráficos de monitoramento de pH, é possível observar discretas diferenças entre os gêneros e espécies estudados. Na biotransformação com as cepas de *Aspergillus* spp. (FF5 e FF3), o controle apresenta uma diminuição no pH em comparação com as outras triplicatas que permaneceram na faixa de 5,5 a 6,0. Essa redução no pH sugere a formação de outros produtos de metabolismo da glicose tais como ácido cítrico, acético e pirúvico no meio de cultura do controle (PAPANIKOLAOU et al., 2008).

No monitoramento do pH dos ensaios de biotransformação com fungo *Penicillium solitum* e *Penicillium* spp. (AR17) demonstrado nas figuras 9 e 13, nota-se que tanto o controle quanto as triplicatas apresentam variação do pH inicial, sugerindo

a formação de compostos originados do metabolismo tanto da glicose quanto do glicerol presentes no meio de cultura.

As cepas *Sarocladium strictum*, *Fusarium* spp. (KR1 e IR8), *Colletotrichum* spp. (BF19BB e BF21BA) e *Penicillium* spp. (BR10) apresentam resultados semelhantes, as amostras permaneceram na mesma faixa de pH (entre 5,5 e 6,0) durante o período observado com pequena redução no último intervalo.

Segundo estudo realizado por Venkata-Suhash & Venkata-Mohan (2013), o pH influencia diretamente na produtividade de lipídios, sendo um fator importante para a formação de biomassa e acumulação de lipídios. A partir dos dados experimentais, apresentados nas figuras de 9 a 18, verificou-se que o pH 5,5 é o mais adequado para crescimento e acúmulo de lipídios. Esta observação também foi apoiada pelo estudo de Lilly & Barnett (1951), indicando que a concentração de prótons no meio (pH) é um fator de influência positivo para o crescimento e outros processos vitais.

Miranti et al (2018), constatou que o pH ideal para a produção de lipídios em *Aspergillus oryzae* foi de 6,0. Sabe-se que uma das principais funções da membrana plasmática é regular o fluxo celular, sendo assim, o pH do meio de cultura pode determinar parâmetros como a permeabilidade da membrana e a morfologia celular. Estudos anteriores investigaram a influência dos valores de pH no meio de cultura e a cinética de crescimento de microrganismos. Nestes trabalhos o pH do meio foi considerado um importante fator ambiental que afeta o crescimento celular e formação de produtos, e os valores de pH entre 5,0 e 6,0 se mostraram os mais adequados para a maior parte dos fungos utilizados no estudo (AMANULLAH, et al., 2001).

5.4 Extração dos compostos

Neste trabalho, foram utilizados dois métodos para extração de compostos. O primeiro foi a extração líquido-líquido com acetato de etila cuja finalidade era a extração de compostos de média polaridade produzidos durante o ensaio de biotransformação. O segundo método foi aquele desenvolvido Bigh&Dyer, utilizado para a extração da fração lipídica. Os resultados do rendimento de ambas metodologias são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Rendimento bruto das extrações líquido-líquido e Bligh & Dyer.

Gênero do fungo (Cepa)	Amostras	Extração líquido- líquido (g)	Rendimento (%)	Extração Bligh&Dyer (g)	Rendimento (%)
<i>Aspergillus</i> spp.(FF5)	C01	0,01	0,10	0,07	0,67
<i>Aspergillus</i> spp.(FF5)	T01.1	0,04	0,43	1,10	11,00
<i>Aspergillus</i> spp.(FF5)	T01.2	0,06	0,61	0,87	8,70
<i>Aspergillus</i> spp.(FF5)	T02.3	0,05	0,52	0,91	9,10
<i>Penicilium solitum</i>	C02	0,08	0,80	0,01	0,12
<i>Penicilium solitum</i>	T02.1	0,08	0,81	0,03	0,31
<i>Penicilium solitum</i>	T02.2	0,08	0,75	0,04	0,42
<i>Penicilium solitum</i>	T02.2	0,07	0,67	0,03	0,25
<i>Sarocladium</i> <i>strictum</i>	C03	0,01	0,10	0,01	0,13
<i>Sarocladium</i> <i>strictum</i>	T03.1	0,08	0,79	0,04	0,35
<i>Sarocladium</i> <i>strictum</i>	T03.2	0,14	1,35	0,05	0,48
<i>Sarocladium</i> <i>strictum</i>	T03.3	0,05	0,46	0,04	0,41
<i>Fusarium</i> spp.(KR1)	C04	0,02	0,16	0,02	0,19
<i>Fusarium</i> spp.(KR1)	T04.1	0,10	1,02	0,02	0,24
<i>Fusarium</i> spp.(KR1)	T04.2	0,10	0,95	0,03	0,31
<i>Fusarium</i> spp.(KR1)	T04.3	0,09	0,86	0,03	0,27
<i>Penicilium</i> spp. (AR17)	C05	0,02	0,20	0,01	0,10
<i>Penicilium</i> spp. (AR17)	T05.1	0,06	0,60	0,02	0,23
<i>Penicilium</i> spp. (AR17)	T05.2	0,04	0,40	0,02	0,19
<i>Penicilium</i> spp. (AR17)	T05.3	0,04	0,40	0,02	0,21
<i>Colletotrichum</i> spp.(BF19BB)	C06	0,01	0,10	0,03	0,34
<i>Colletotrichum</i> spp.(BF19BB)	T06.1	0,05	0,50	0,05	0,48
<i>Colletotrichum</i> spp.(BF19BB)	T06.2	0,06	0,60	0,03	0,32
<i>Colletotrichum</i> spp.(BF19BB)	T06.3	0,04	0,40	0,03	0,31
<i>Penicilium</i> spp. (BR10)	C07	0,07	0,70	0,02	0,21
<i>Penicilium</i> spp. (BR10)	T07.1	0,08	0,80	0,70	7,00
<i>Penicilium</i> spp. (BR10)	T07.2	0,06	0,60	0,85	8,50
<i>Penicilium</i> spp. (BR10)	T07.3	0,05	0,50	1,30	13,00
<i>Aspergillus</i> spp. (FF3)	C8	0,06	0,60	0,06	0,60
<i>Aspergillus</i> spp. (FF3)	T08.1	0,09	0,90	0,69	6,90
<i>Aspergillus</i> spp. (FF3)	T08.2	0,07	0,70	0,73	7,30
<i>Aspergillus</i> spp. (FF3)	T08.3	0,08	0,80	0,86	8,60

<i>Fusarium</i> spp. (IR8)	C9	0,02	0,20	0,02	0,19
<i>Fusarium</i> spp. (IR8)	T09.1	0,03	0,30	0,04	0,37
<i>Fusarium</i> spp. (IR8)	T09.2	0,04	0,40	0,03	0,31
<i>Fusarium</i> spp. (IR8)	T09.3	0,04	0,40	0,03	0,29
<i>Colletotrichum</i> spp.(BF21BA)	C10	0,01	0,10	0,02	0,18
<i>Colletotrichum</i> spp.(BF21BA)	T10.1	0,03	0,30	0,04	0,35
<i>Colletotrichum</i> spp.(BF21BA)	T10.2	0,05	0,50	0,03	0,28
<i>Colletotrichum</i> spp.(BF21BA)	T10.3	0,03	0,30	0,02	0,23

O rendimento em porcentagem foi calculado pela divisão da massa obtida na extração pelo total de glicerol utilizado (10 g) no ensaio de biotransformação multiplicado por 100.

Na extração líquido-líquido, apesar do baixo rendimento, foi possível perceber que outros compostos orgânicos foram extraídos quando o material foi submetido a purificação por CCD com sílica gel 60 preparativa. Além de compostos orgânicos, parte do glicerol que não foi assimilado pelos fungos no ensaio de biotransformação foi co-extraído, como foi observado em algumas amostras.

A extração de lipídeos é um procedimento extremamente importante em análises de teor lipídico e composição dos ácidos graxos, portanto, deve ser realizada com exatidão e precisão. Alguns fatores como a co-extração dos componentes não lipídicos e a oxidação indesejada podem intervir no resultado da propriedade final da fração lipídica (BRUM; ARRUDA; REGITANO-D'ARCE, 2009).

Com relação à produção de lipídios, o rendimento da biotransformação foi baixo, sendo em média 9,5% para *Aspergillus* spp. (FF5), 7,6 % para *Aspergillus* (FF3) e 14,25 % para *Penicillium* spp.

Peng & Cheng (2007) realizaram uma triagem de cepas para a produção de óleo microbiano com 141 fungos endofíticos, isolados a partir de caules de plantas oleaginosas. Estes autores observaram que vinte e seis isolados apresentaram maior acúmulo de lipídios, cujos microrganismos pertenciam a cinco gêneros, *Microsphaeropsis* spp, *Phomopsis* spp, *Cephalosporium* spp, *Sclerocystis* spp e *Nigrospora* spp. Estes fungos foram cultivados em estado sólido utilizando palha e farelo de trigo como substrato e apresentaram um rendimento de óleo variando de 21,3 – 35 %.

5.5 Análise dos espectros de IV-TF

Para a atribuição de sinais espectrais foram consultados dados da literatura (SILVERSTEIN et al., 1994; PAVIA et al., 2001; BREITMEYER, 2002; MIGLIO et al., 2013 e GUILLEN et al., 2003). Inicialmente foi realizada uma análise do material de partida do glicerol (Figura 19 e Tabela 7), e observou-se uma banda intensa em torno

de 3368 cm^{-1} relativa ao estiramento O-H das hidroxilas e as bandas características do metileno em 2942 e 2884 cm^{-1} referentes ao estiramento simétrico e assimétrico respectivamente. Em torno de 1420 cm^{-1} encontram-se bandas de acoplamento da deformação dos CH_2 metilênicos e das ligações C-O-H das hidroxilas e em 1100 cm^{-1} são observadas as bandas de estiramento das ligações C-O (SILVERSTEIN, et al. 1994).

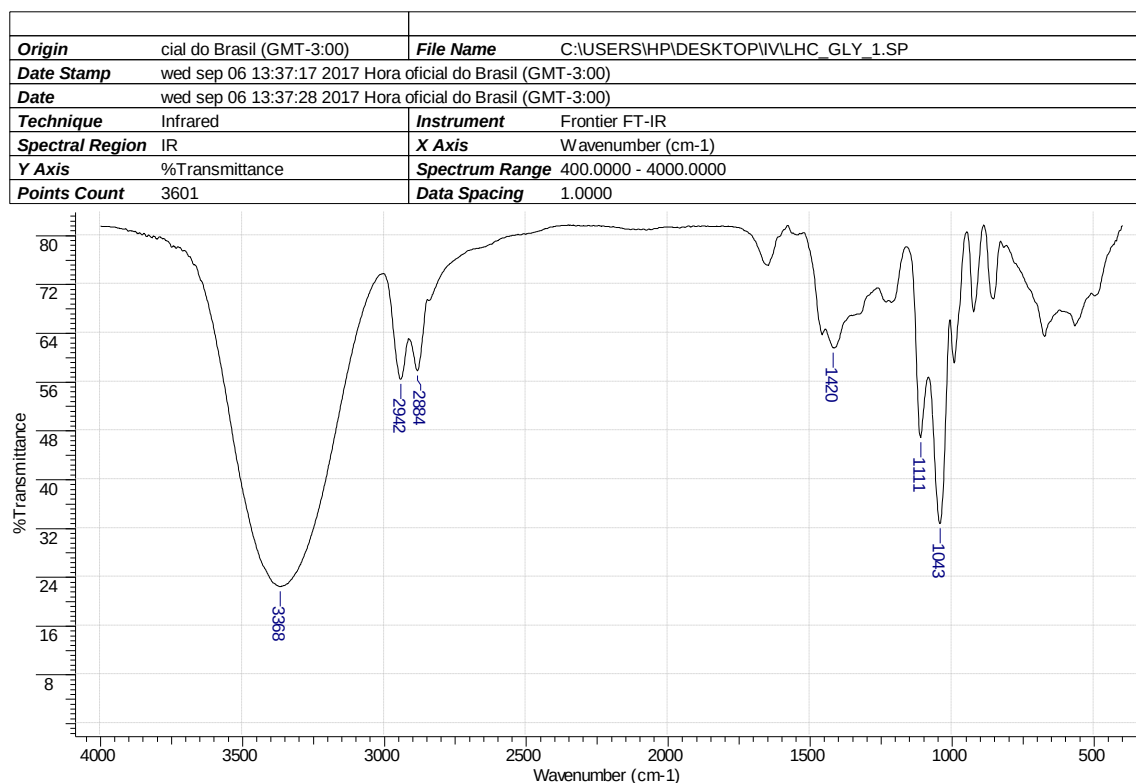


Figura 19. Espectro de Infravermelho do glicerol utilizado como fonte de carbono nos ensaios de biotransformação.

Tabela 7. Atribuição das bandas de absorção de IV-TF a grupos funcionais do glicerol.

$\nu_{\text{MAX}} (\text{cm}^{-1})$	Atribuição
3008	Estiramento O-H
2884 e 2942	Estiramento C-H
1420	Deformação C-H metilênico
1111 e 1043	Estiramento C-O

Nos espectros de infravermelho obtidos dos lipídios extraídos da biotransformação pelo método Bligh & Dyer com as cepas *Aspergillus* spp. (FF3), *Aspergillus* spp. (FF5) e *Penicillium* spp. (BR10) (Figuras 20, 21 e 22,

respectivamente), as bandas apresentadas indicam a presença de ácidos graxos (AFSETH & KOHLER, 2012). Também foi possível perceber uma ausência de bandas de estiramento -OH , isso demonstra que o glicerol utilizado no meio de cultura foi assimilado pelo fungo durante o ensaio de biotransformação (Figura 20). Pode-se confirmar a presença de banda olefínica CH=CH em 3008 cm^{-1} . Observam-se ainda os sinais em 2927 e 2855 cm^{-1} , correspondente a vibração de estiramento C-H de cadeia alifáticas e em 1746 cm^{-1} indica a banda da carbonila (C=O) de ésteres (MIGLIO et al., 2013).

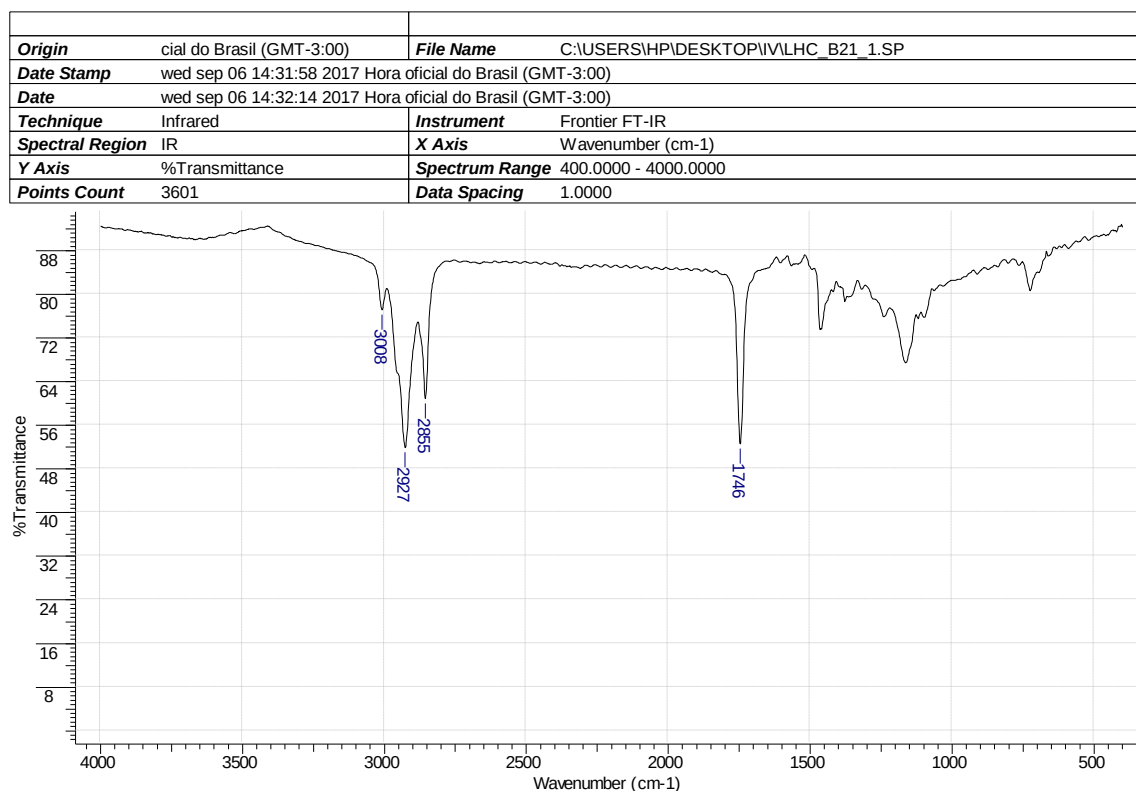


Figura 20. Espectro de IV dos lipídios extraídos de *Aspergillus* spp. (FF5).

Tabela 8. Atribuição das bandas de absorção de IV dos lipídios extraídos de *Aspergillus* spp. (FF5).

$\nu_{\text{MAX}} (\text{cm}^{-1})$	Atribuição
3008	Estiramento CH=CH
2927 e 2855	Estiramento C-H
1746	Estiramento C=O

8 May 2018

Title	cial do Brasil (GMT-3:00)	Comment	Amostra 062 por Iscm data quarta-feira, setembro 06 2017
Origin	cial do Brasil (GMT-3:00)	File Name	C:\USERS\HP\DESKTOP\IVLHC_B22_1.SP
Date Stamp	wed sep 06 14:22:46 2017 Hora oficial do Brasil (GMT-3:00)		
Date	wed sep 06 14:23:10 2017 Hora oficial do Brasil (GMT-3:00)		
Technique	Infrared	Instrument	Frontier FT-IR
Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Y Axis	%Transmittance	Spectrum Range	400.0000 - 4000.0000
Points Count	3601	Data Spacing	1.0000

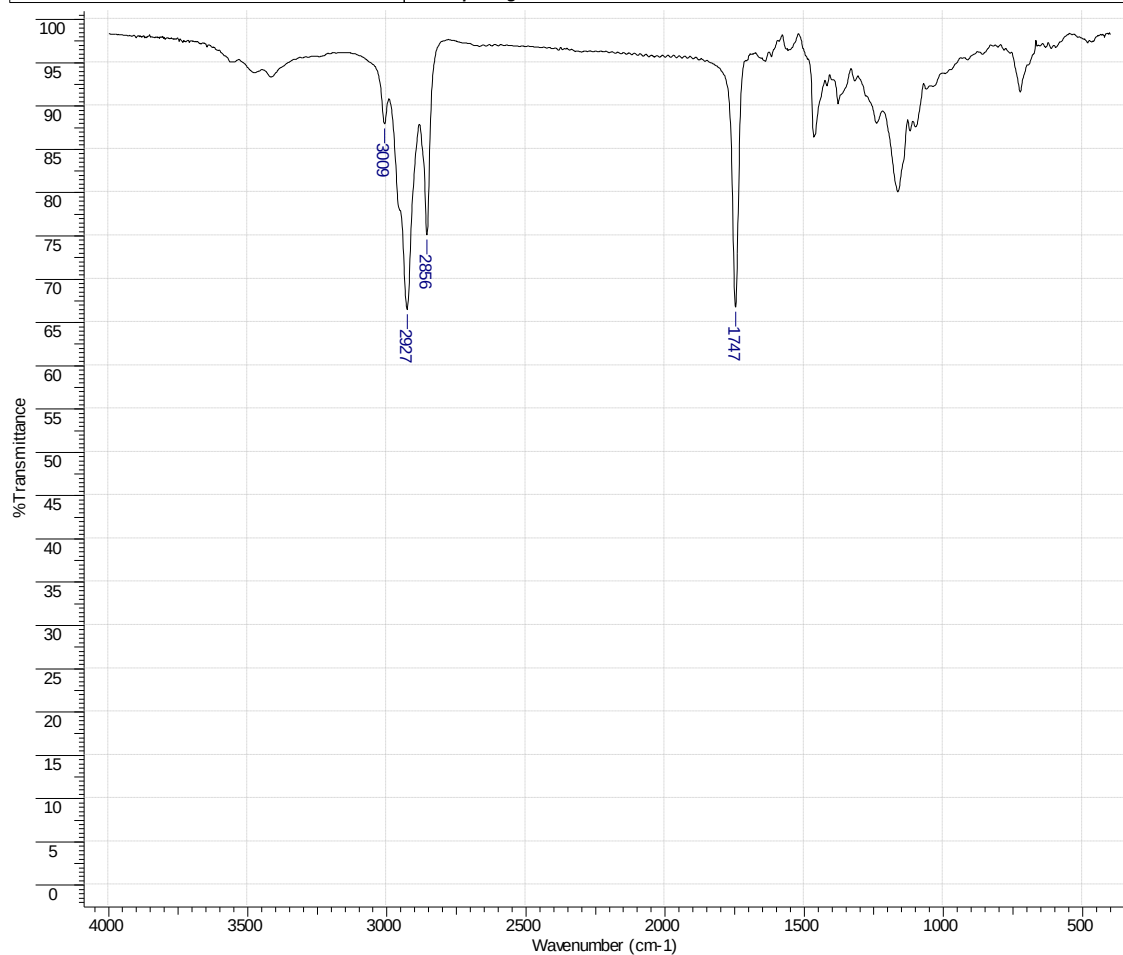


Figura 21. Espectro de IV dos lipídios extraídos de *Aspergillus* spp. (FF3).

Tabela 9. Atribuição das bandas de absorção de IV dos lipídios extraídos de *Aspergillus* spp. (FF3).

ν_{MAX} (cm ⁻¹)	Atribuição
3009	Estiramento CH=CH
2927 e 2856	Estiramento C-H
1747	Estiramento C=O

Title	cial do Brasil (GMT-3:00)	Comment	Amostra 094 por Iscm data sexta-feira, setembro 22 2017
Origin	cial do Brasil (GMT-3:00)	File Name	C:\USERS\HP\DESKTOP\VALHC_C2B2_1.SP
Date Stamp	fri sep 22 15:03:02 2017 Hora oficial do Brasil (GMT-3:00)		
Date	fri sep 22 15:03:23 2017 Hora oficial do Brasil (GMT-3:00)		
Technique	Infrared	Instrument	Frontier FT-IR
Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Y Axis	%Transmittance	Spectrum Range	500.0000 - 4000.0000
Points Count	3501	Data Spacing	1.0000

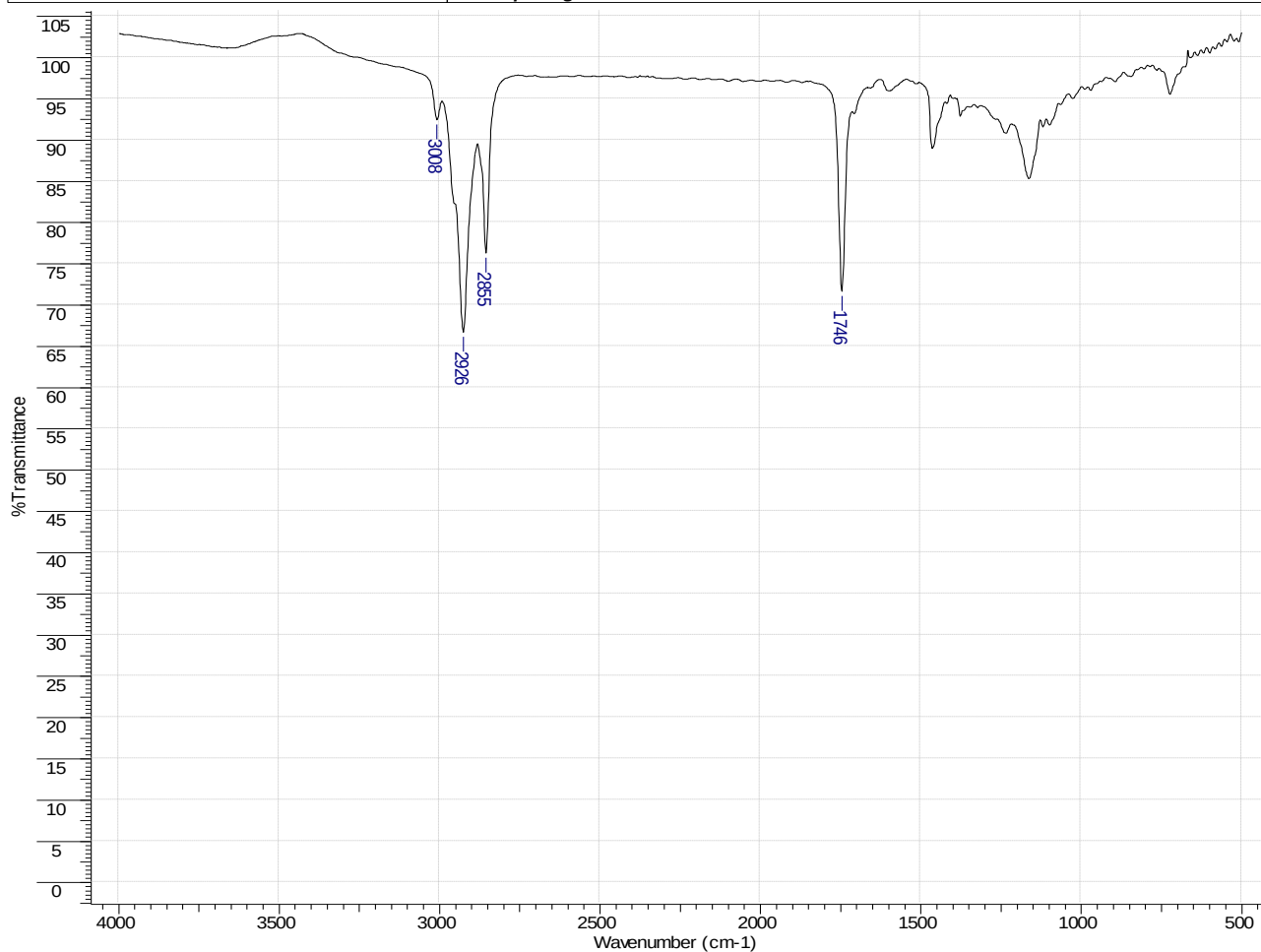


Figura 22. Espectro de IV dos lipídios extraídos de *Penicillium* spp. (BR10).

Tabela 10. Atribuição das bandas de absorção de IV dos lipídios extraídos de *Penicillium* spp. (BR10).

ν_{MAX} (cm ⁻¹)	Atribuição
3008	Estiramento CH=CH
2926 e 2855	Estiramento C-H
1746	Estiramento C=O

A comparação entre os espectros de IV do glicerol e do produto da extração de lipídios das cepas de *Aspergillus* spp. (FF3), *Aspergillus* spp. (FF5) e *Penicillium* spp. (BR10) nos mostraram que o glicerol foi utilizado na biotransformação como fonte de carbono para produção de triacilgliceróis.

Em estudo realizado por Kosa et al., 2018 foi utilizado análise de FT-IV combinado com o sistema de cultivo em microplacas de alto rendimento para a seleção de fungos oleaginosos. Os autores conseguiram selecionar os fungos dos gêneros *Mucor* spp, *Rhizopus* spp, *Umbelopsis* spp, *Absidia* spp, *Cunninghamella* spp, *Lichteimia* spp e *Mortirella* spp. Nos espectros foi possível detectar as mesmas bandas encontradas em nosso trabalho, próximas das regiões 3000, 2900 e 2800 e 1700 que são referentes as ligações CH=CH, C-H e C=O respectivamente.

5.6 Análise dos espectros RMN de ^1H

Os espectros dos extratos lipídicos extraídos das biotransformações do glicerol com as cepas de *Aspergillus* spp. (FF3), *Aspergillus* spp. (FF5) e *Penicillium* spp. (BR10) apresentaram sinais similares aos triacilgliceróis correspondentes aos ésteres dos ácidos oléico e linoléico. As Figuras 23 a 30 apresentam os espectros de RMN ^1H que mostram claramente duas regiões distintas: tripletos na região entre 2,77 ppm ($J = 6,0$ Hz) corresponde aos valores de CH_2 entre as duplas ligações com indicação da formação de triacilglicerol com cadeias poli-insaturadas e 0,90 ppm, correspondentes aos hidrogênios das cadeias alquilas dos ésteres dos ácidos graxos saturados e insaturados. Os sinais situados na região 5,31 – 5,37 ppm representam hidrogênios olefínicos, que estão presentes nos ácidos oleico e linoleico (Figuras 25, 28 e 31). Esses resultados (deslocamentos químicos) foram obtidos comparando a compostos semelhantes na literatura (GUILLÉN & RUIZ, 2003).

Os sinais em 1,58 ppm referem-se aos hidrogênios ligados ao carbono 4 do éster; entre 1,97 – 2,03 ppm ($J = 6,0$ Hz), aos hidrogênios 11; entre 2,25 – 2,31 ppm ($J = 7,5$ HZ), aos hidrogênios de carbonos 3 do éster; entre 4,10 – 4,24 ppm, aos hidrogênios 1' e 3'; entre 5,22– 5,25 ppm, ao hidrogênio metínico 2'; entre 5,31 – 5,36 ppm, aos hidrogênios metínicos das duplas ligações. Esses sinais podem ser visualizados nas Tabelas 11, 12 e 13 com os deslocamentos identificados com base no trabalho de Guillén & Ruiz (2003).

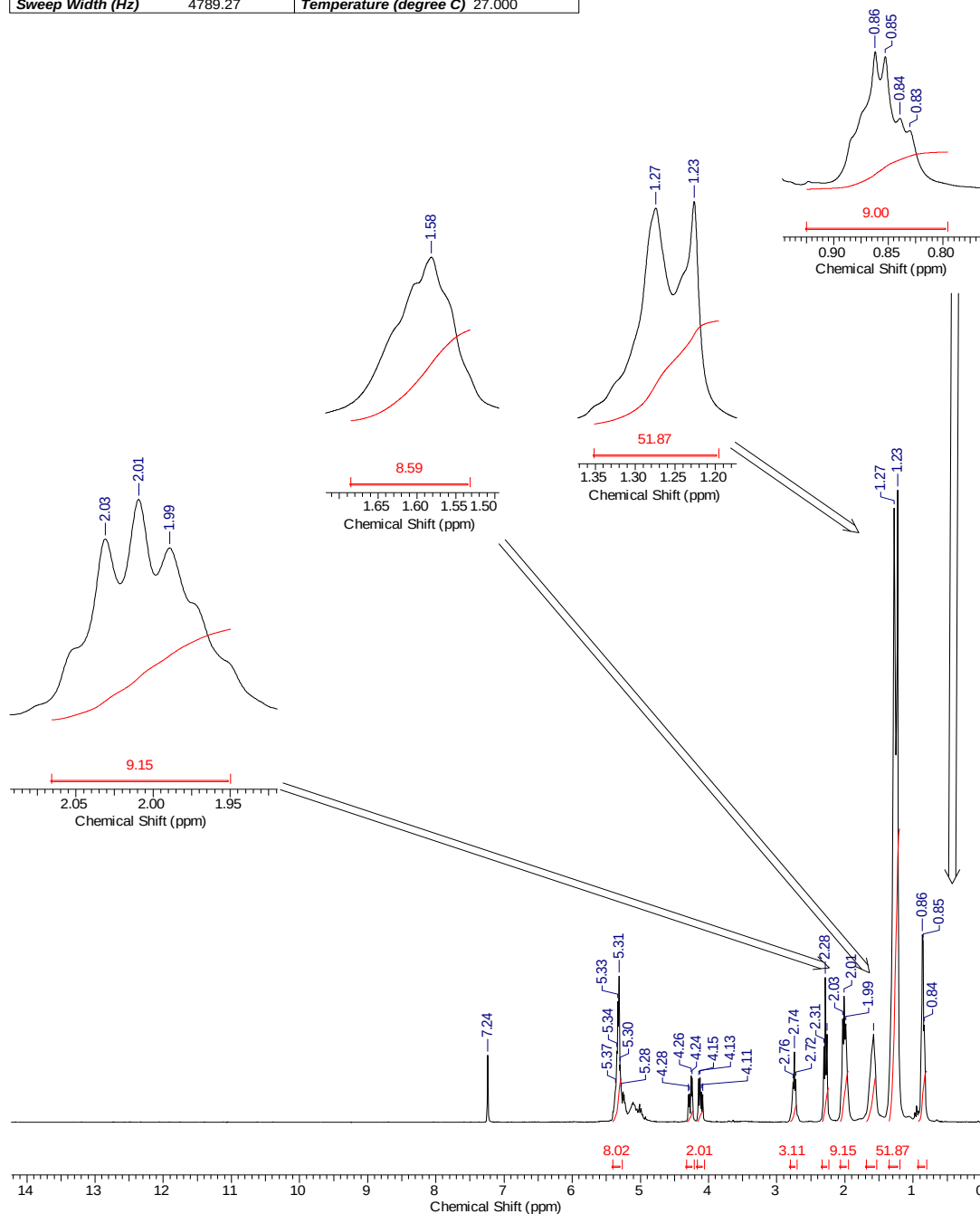


Figura 23. Espectro de RMN de ^1H obtido do extrato lipídico da cepa de *Aspergillus* spp. (FF5) com ampliações das regiões 0,83 – 0,86 ppm; 1,23 – 1,27 ppm; 1,58 ppm e 1,99 – 2,03 ppm.

8 May 2018

Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H- CDCl3- G1- ADILSON- LUIS
Date	30 Jan 2018 08:18:20		
File Name	C:\Users\HP\Desktop\1\G1_001001r	Frequency (MHz)	300.13
Nucleus	1H	Number of Transients	8
Points Count	65536	Original Points Count	32768
Sweep Width (Hz)	4789.27	Pulse Sequence	zg
		Solvent	CHLOROFORM-D
		Temperature (degree C)	27.000

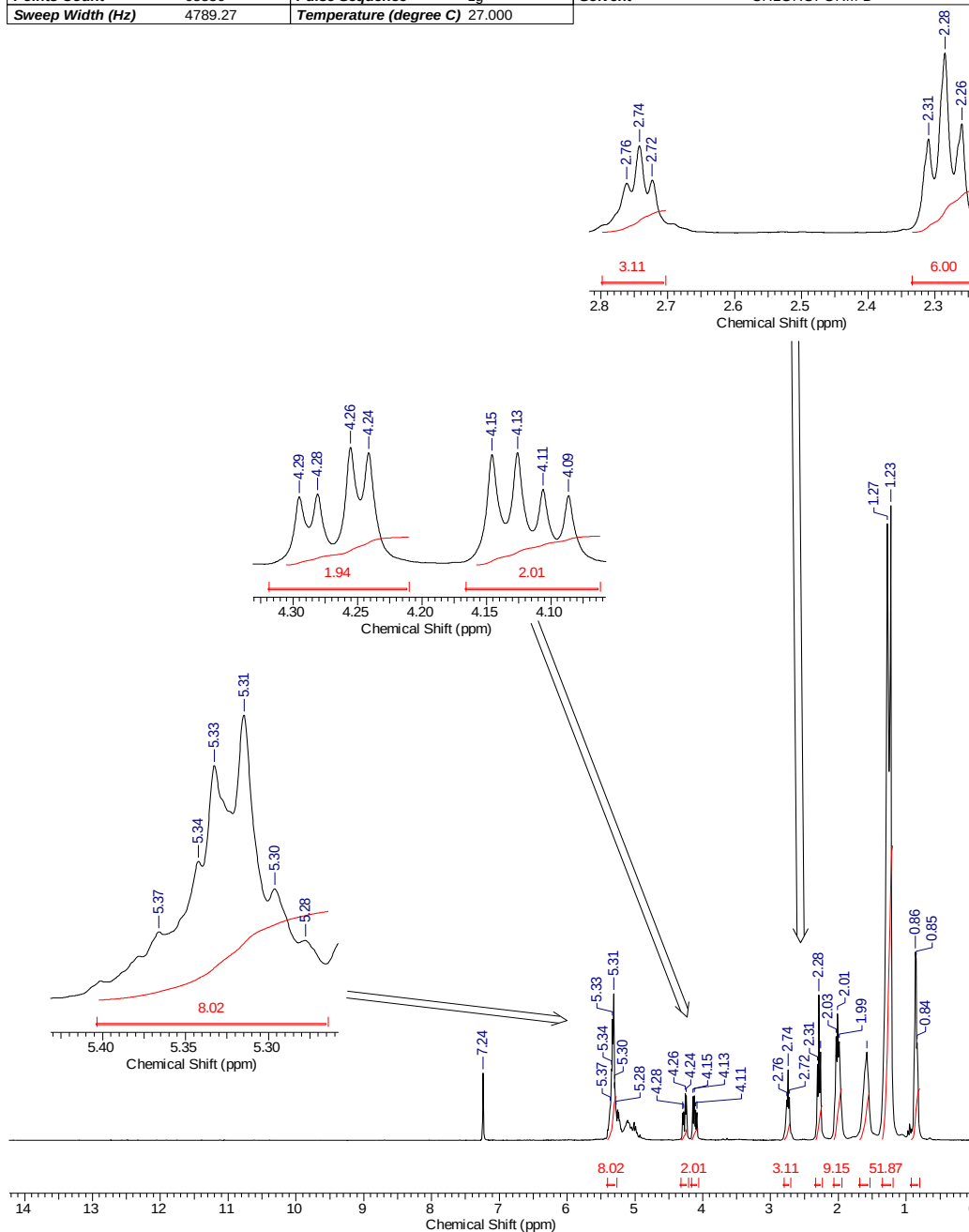


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H obtido do extrato lipídico da cepa de *Aspergillus* spp. (FF5) com ampliações das regiões 2,26 – 2,76 ppm; 4,09 – 4,29 ppm e 5,28 – 5,37ppm.

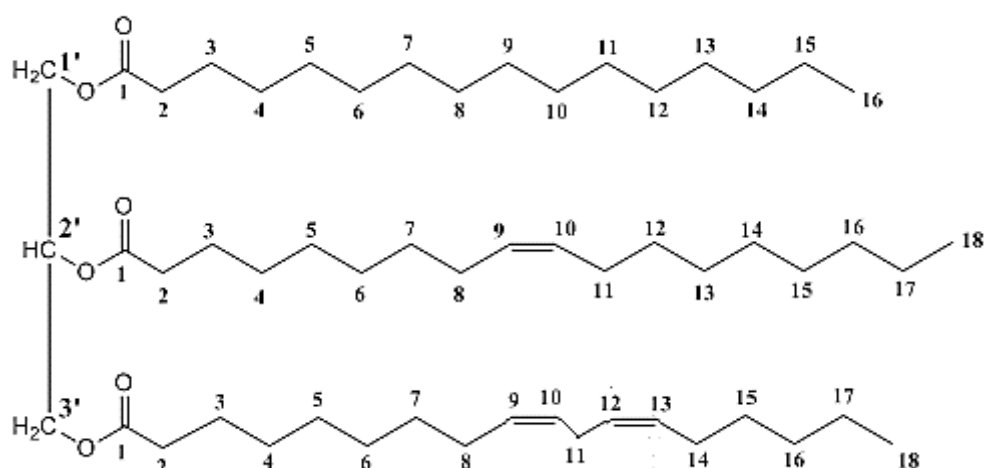


Figura 25. Molécula de triacilglicerídeo composta pelos ácidos graxos: palmítico, oleico e linoleico,

Tabela 11. Atribuição de sinais

Hidrogênios (resíduo do glicerol)	Hidrogênios (oleico)	Hidrogênios (linoleico)	δ (ppm)
	18	18	0,83-0,86 (m)
	12-17 e 4-7	4-7 e 15-17	1,23-1,27 (d, $J= 12,0$ Hz)
	3	3	1,58
	8 e 11	8 e 14	1,99-2,03 (t, $J= 6,0$ Hz)
	2	2	2,26-2,31 (t, $J= 7,5$ Hz)
		11	2,72-2,76 (t, $J= 6,0$ Hz)
1' e 3'			4,09-4,11(d, $J= 6,0$ Hz)
1' e 3'			4,13-4,15 (d, $J= 6,0$ Hz)
1' e 3'			4,24-4,26 (d, $J= 6,0$ Hz)
1' e 3'			4,28-4,29 (d, $J= 3,0$ Hz)
2'	9 e 10	9-10 e 12-13	5,28-5,37 (m)

8 May 2018

Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H- CDCl3- CONTROLE C2- EDSON- LUIS
Date	16 Jan 2018 09:22:16		
File Name	C:\Users\HP\Desktop\IV\CONTROLE C2_001001r	Frequency (MHz)	300.13
Nucleus	1H	Number of Transients	8
Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Sweep Width (Hz)	4789.27	Temperature (degree C)	27.000
		Solvent	CHLOROFORM-D

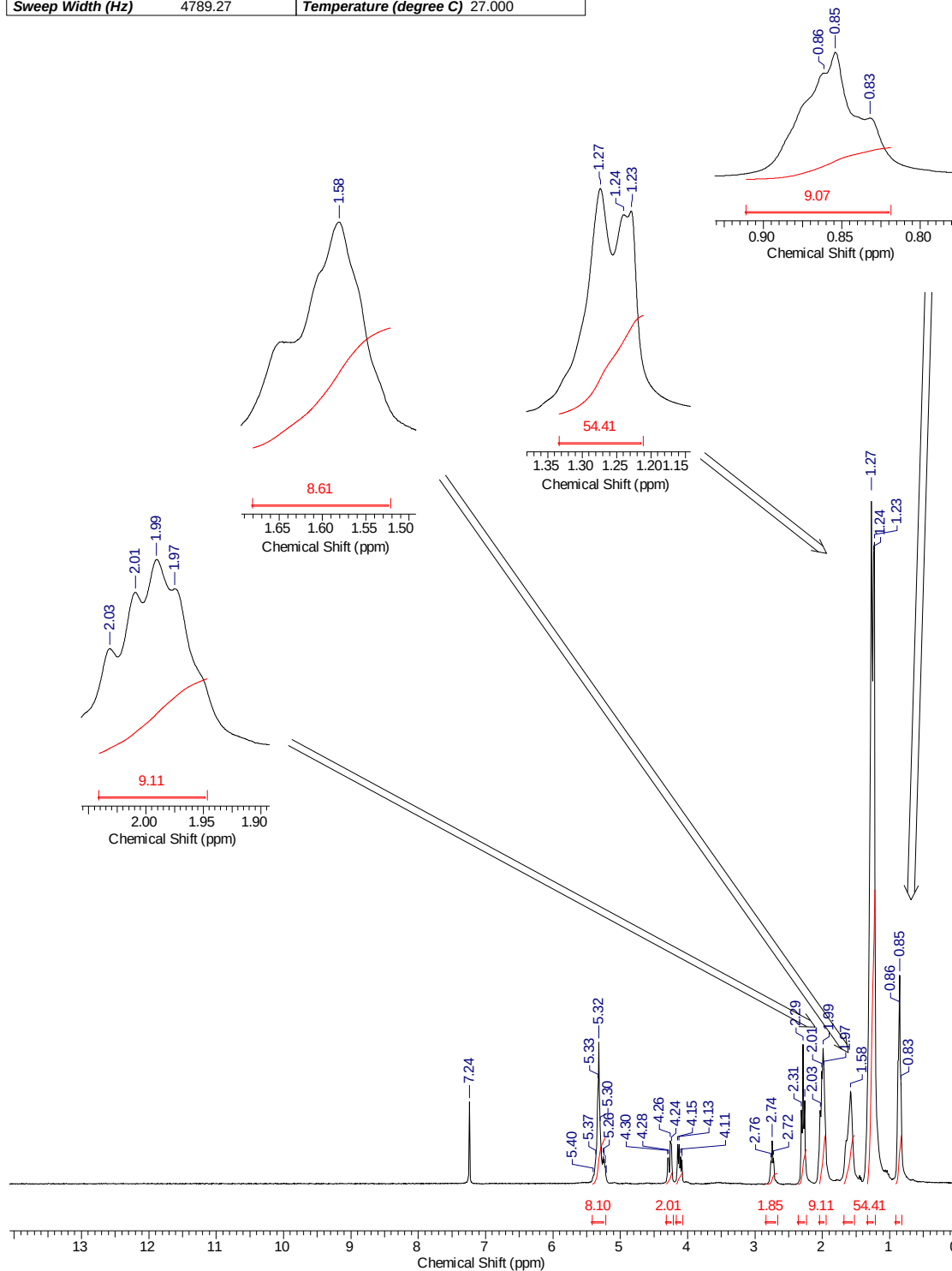


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H obtido do extrato lipídico da cepa de *Aspergillus* spp. (FF3) com ampliações das regiões 0,83 – 0,86 ppm; 1,23 – 1,27 ppm; 1,58 ppm e 1,97 – 2,03 ppm.

8 May 2018

Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H- CDCI3- CONTROLE C2- EDSON- LUIS
Date	16 Jan 2018 09:22:16		
File Name	C:\Users\HP\Desktop\1H\CONTROLE C2_001001r	Frequency (MHz)	300.13
Nucleus	¹ H	Number of Transients	8
Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Sweep Width (Hz)	4789.27	Temperature (degree C)	27.000
		Solvent	CHLOROFORM-D

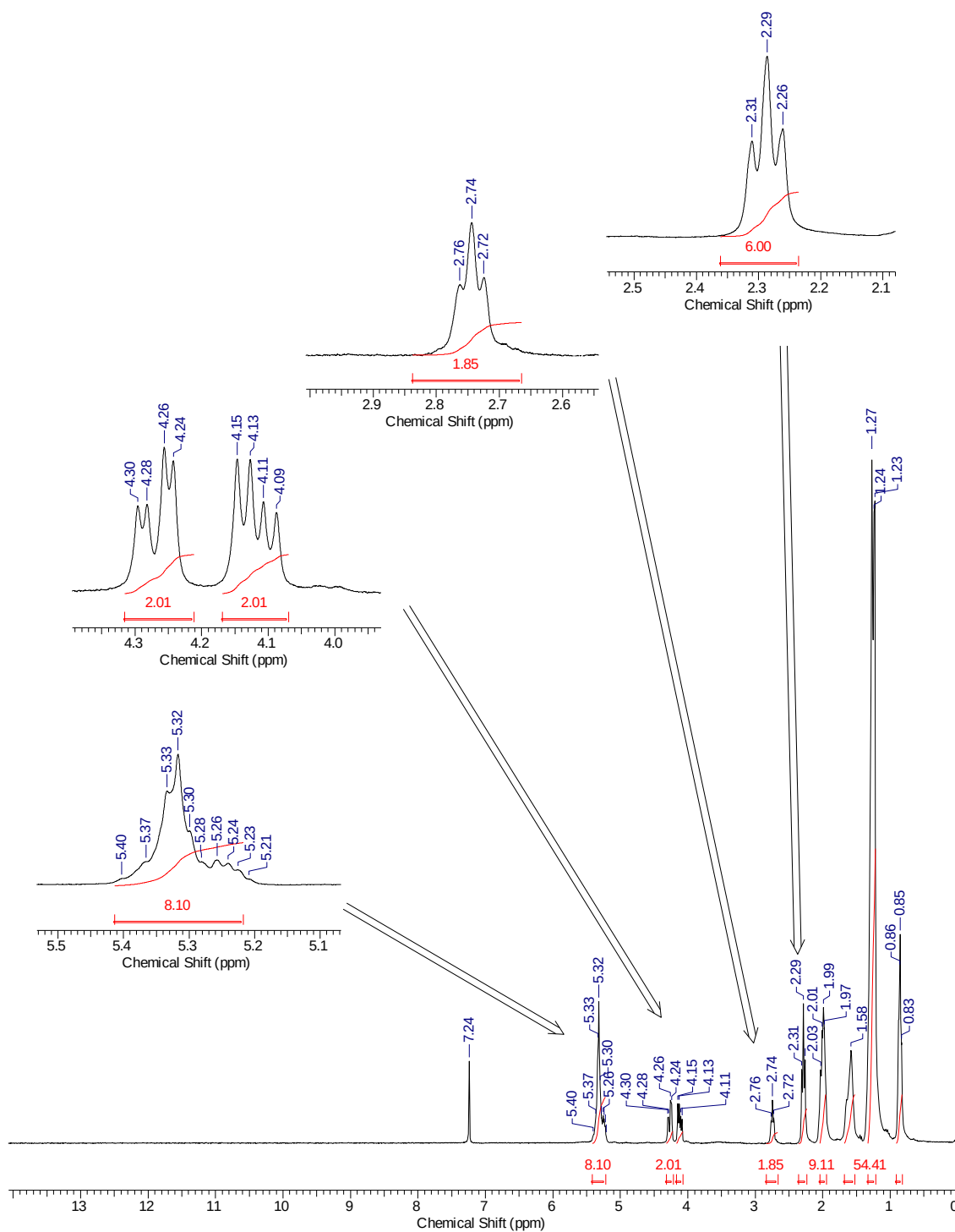


Figura 27. Espectro de RMN de ¹H obtido do extrato lipídico da cepa de *Aspergillus* spp. (FF3) com ampliações das regiões 2,26 – 2,76 ppm; 4,09 – 4,30 ppm e 5,21 – 5,40 ppm.

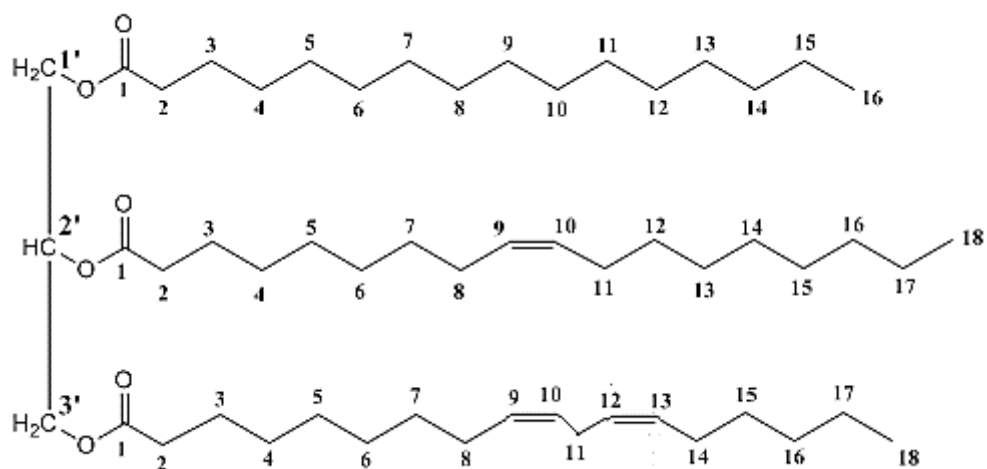


Figura 28. Molécula de triacilglicerídeo composta pelos ácidos graxos: palmítico, oleico e linoleico,

Tabela 12. Atribuição de sinais

Hidrogênios (resíduo do glicerol)	Hidrogênios (oleico)	Hidrogênios (linoleico)	δ (ppm)
	18	18	0,83-0,86 (m)
	12-17 e 4-7	4-7 e 15-17	1,23-1,27 (m)
	3	3	1,58
	8 e 11	8 e 14	1,97-2,03 (m)
	2	2	2,26-2,31 (t, $J=7,5$ Hz)
		11	2,72-2,76 (t, $J=6,0$ Hz)
1' e 3'			4,09-4,11(d, $J=6,0$ Hz)
1' e 3'			4,13-4,15 (d, $J=6,0$ Hz)
1' e 3'			4,24-4,26 (d, $J=6,0$ Hz)
1' e 3'			4,28-4,30 (d, $J=6,0$ Hz)
2'	9 e 10	9-10 e 12-13	5,21-5,40 (m)

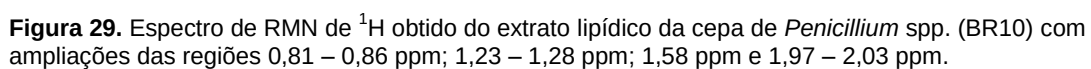


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H obtido do extrato lipídico da cepa de *Penicillium* spp. (BR10) com ampliações das regiões 0,81 – 0,86 ppm; 1,23 – 1,28 ppm; 1,58 ppm e 1,97 – 2,03 ppm.

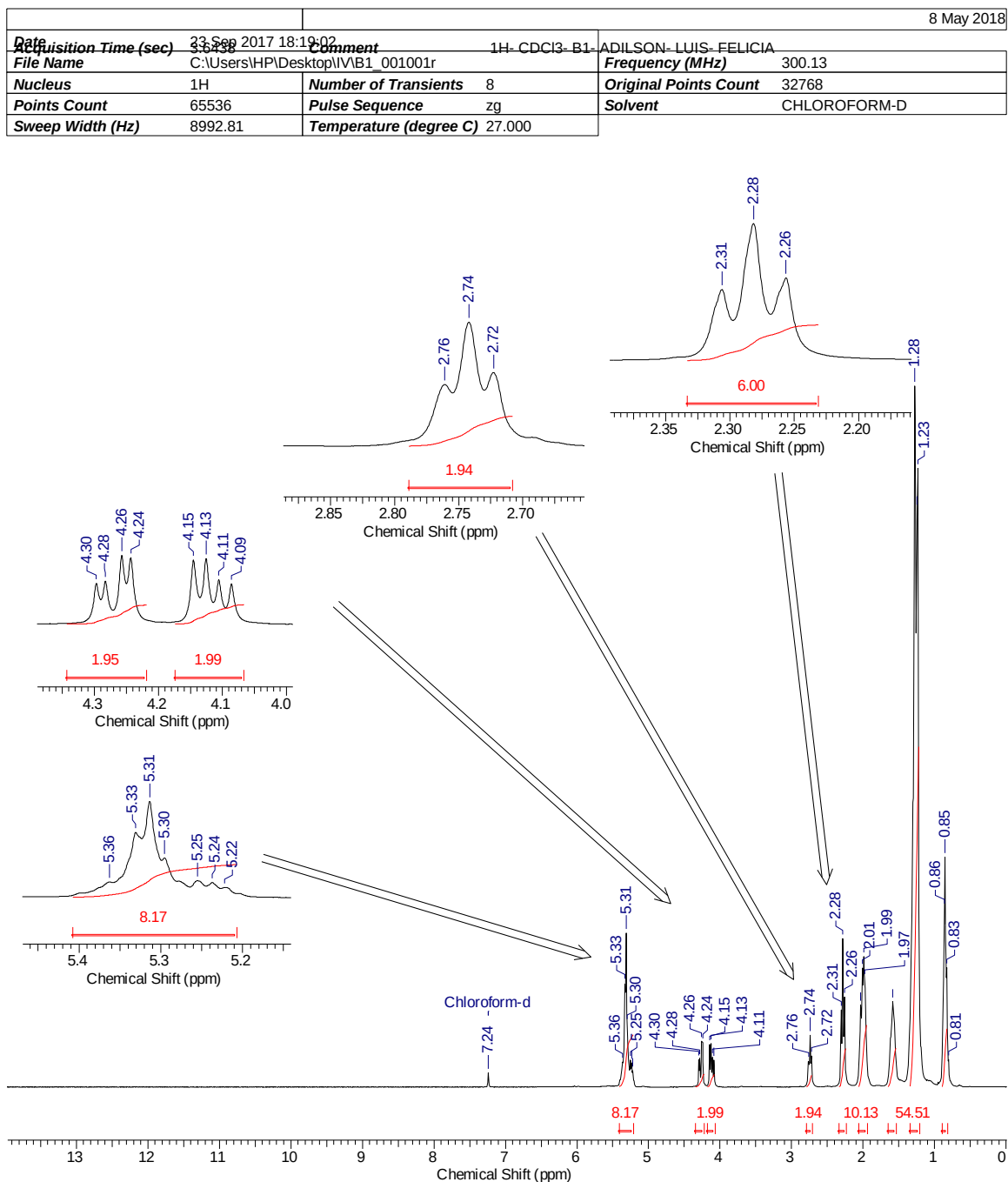


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H obtido do extrato lipídico da cepa de *Penicillium* spp. (BR10) com ampliações das regiões 2,26 – 2,76 ppm; 4,09 – 4,30 ppm e 5,22 – 5,36 ppm.

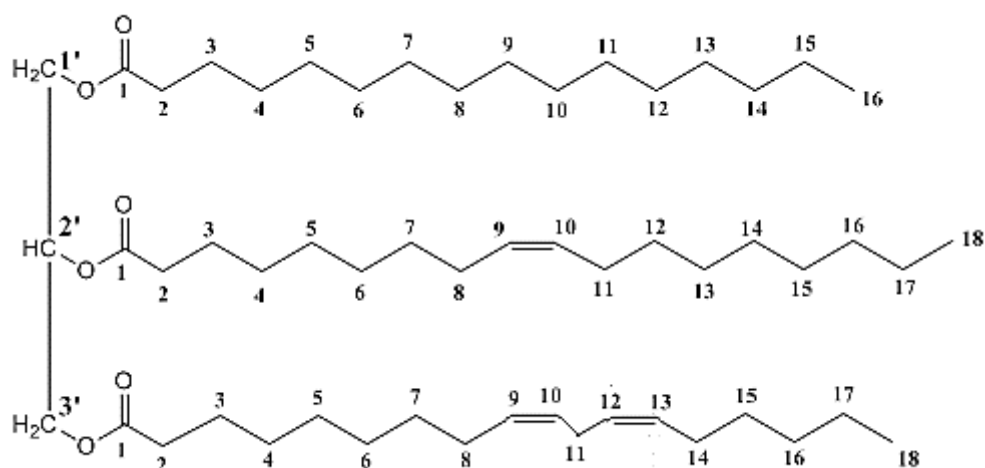


Figura 31. Molécula de triacilglicerídeo composta pelos ácidos graxos: palmítico, oleico e linoleico,

Tabela 13. Atribuição de sinais

Hidrogênios (resíduo do glicerol)	Hidrogênios (oleico)	Hidrogênios (linoleico)	δ (ppm)
	18	18	0,81-0,86 (m)
	12-17 e 4-7	4-7 e 15-17	1,23-1,28 (m)
	3	3	1,58
	8 e 11	8 e 14	1,97-2,03 (m)
	2	2	2,26-2,31 (t, $J = 7,5$ Hz)
		11	2,72-2,76 (t, $J = 6,0$ Hz)
1' e 3'			4,09-4,11(d, $J = 6,0$ Hz)
1' e 3'			4,13-4,15 (d, $J = 6,0$ Hz)
1' e 3'			4,24-4,26 (d, $J = 6,0$ Hz)
1' e 3'			4,28-4,30 (d, $J = 6,0$ Hz)
2'	9 e 10	9-10 e 12-13	5,22-5,36 (m)

A análise dos espectros obtidos nos permitiu identificar os sinais referentes aos hidrogênios presentes na molécula de triacilgliceróis da amostra biotransformada pelas cepas *Aspergillus* spp. (FF3), *Aspergillus* spp. (FF5) e *Penicillium* spp. (BR10). Os sinais referentes ao deslocamento químico em 2,72 a 2,76 ppm indicam a presença de hidrogênios entre duplas ligações, sugerindo a formação de triacilgliceróis com cadeias poli-insaturadas (PUFAS). Essa observação de sinais no espectro de RMN de

^1H corrobora com o resultado encontrado na análise por IV-TF, onde foi possível constatar a banda olefínica $\text{CH}=\text{CH}$ em 3008 cm^{-1} que também indica a formação de triacilgliceróis com cadeias poli-insaturadas.

5.7. ANÁLISE DE CG-MS

Com a finalidade de quantificar os ácidos graxos poli-insaturados produzidos pelos fungos *Aspergillus* spp. (FF5), *Aspergillus* spp. (FF3) e *Penicillium* spp. (BR10) durante o ensaio de biotransformação foi realizado a derivatização e posterior análise em cromatógrafo. As Figuras 32 a 34 apresentam os cromatogramas obtidos.

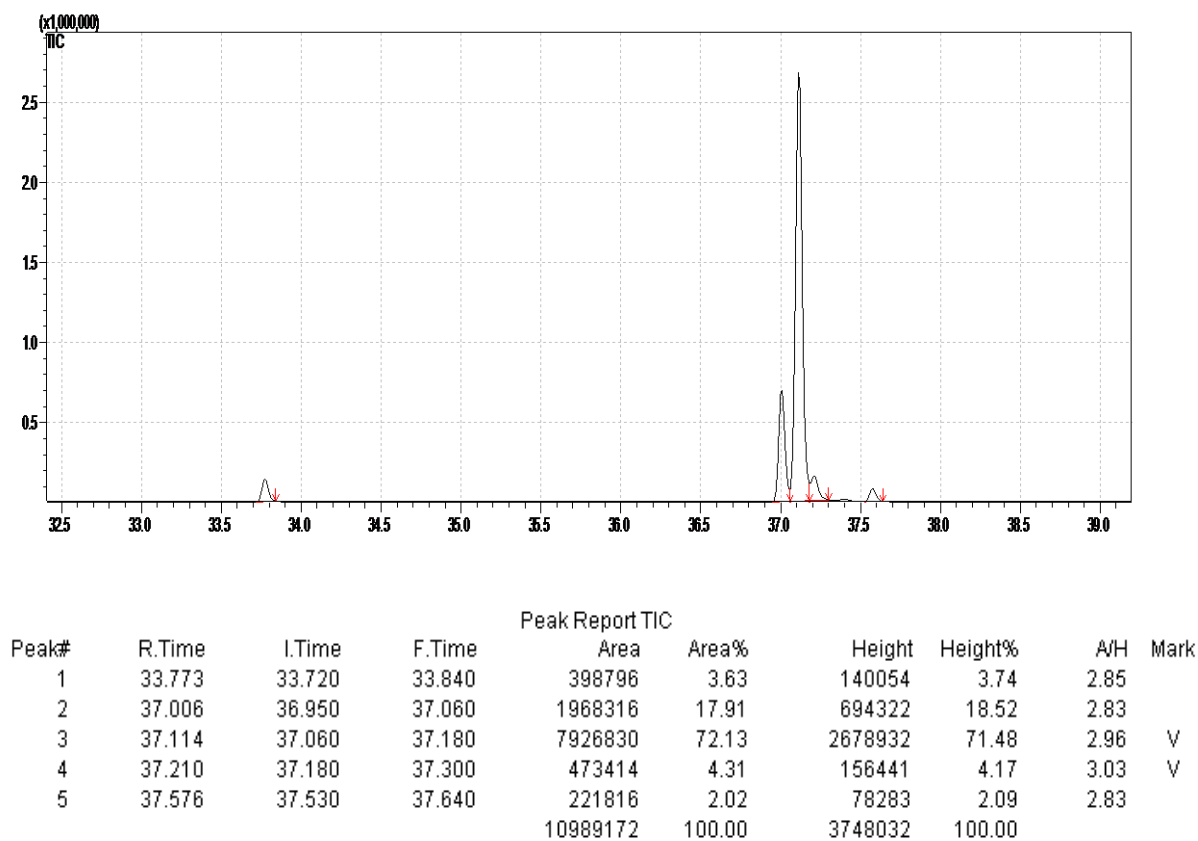


Figura 32. Cromatograma referente aos lipídios extraídos da biotransformação com a cepa *Aspergillus* spp. (FF5) obtido após derivatização.

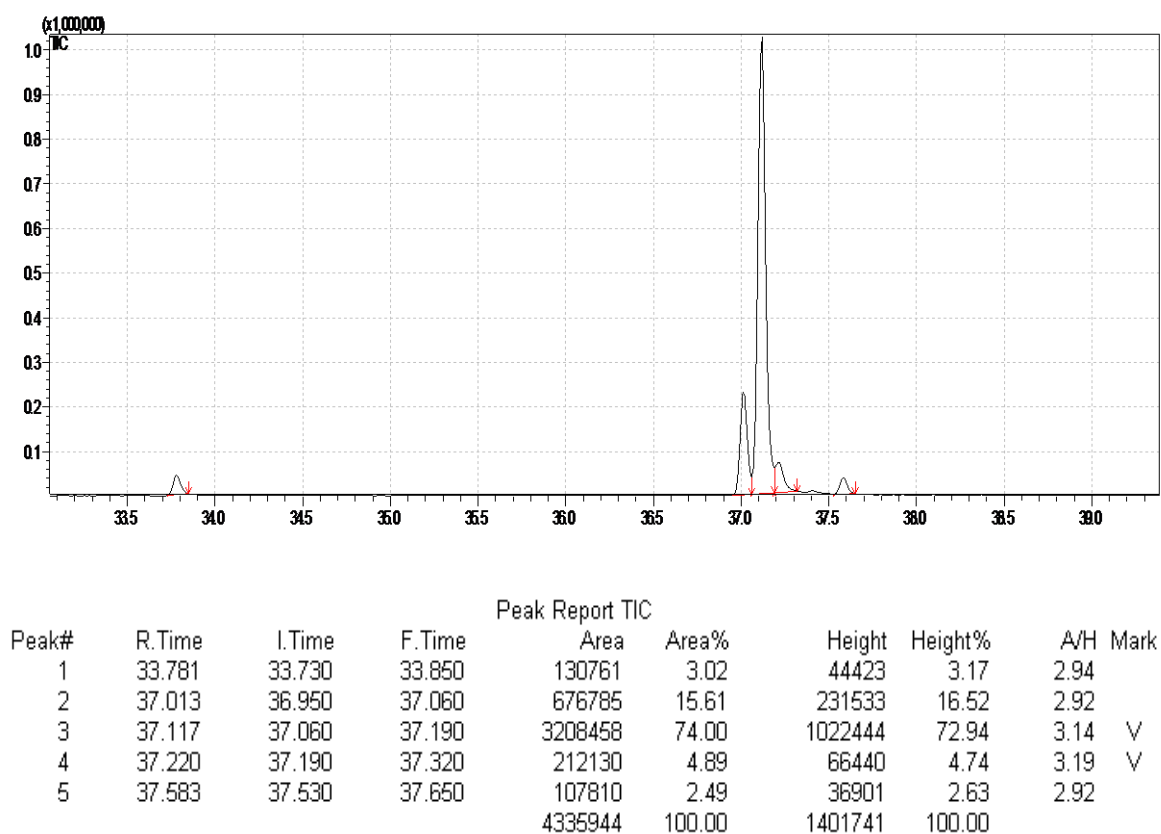


Figura 33. Cromatograma referente aos lipídios extraídos da biotransformação com a cepa *Aspegillus* spp. (FF3) obtido após derivatização.

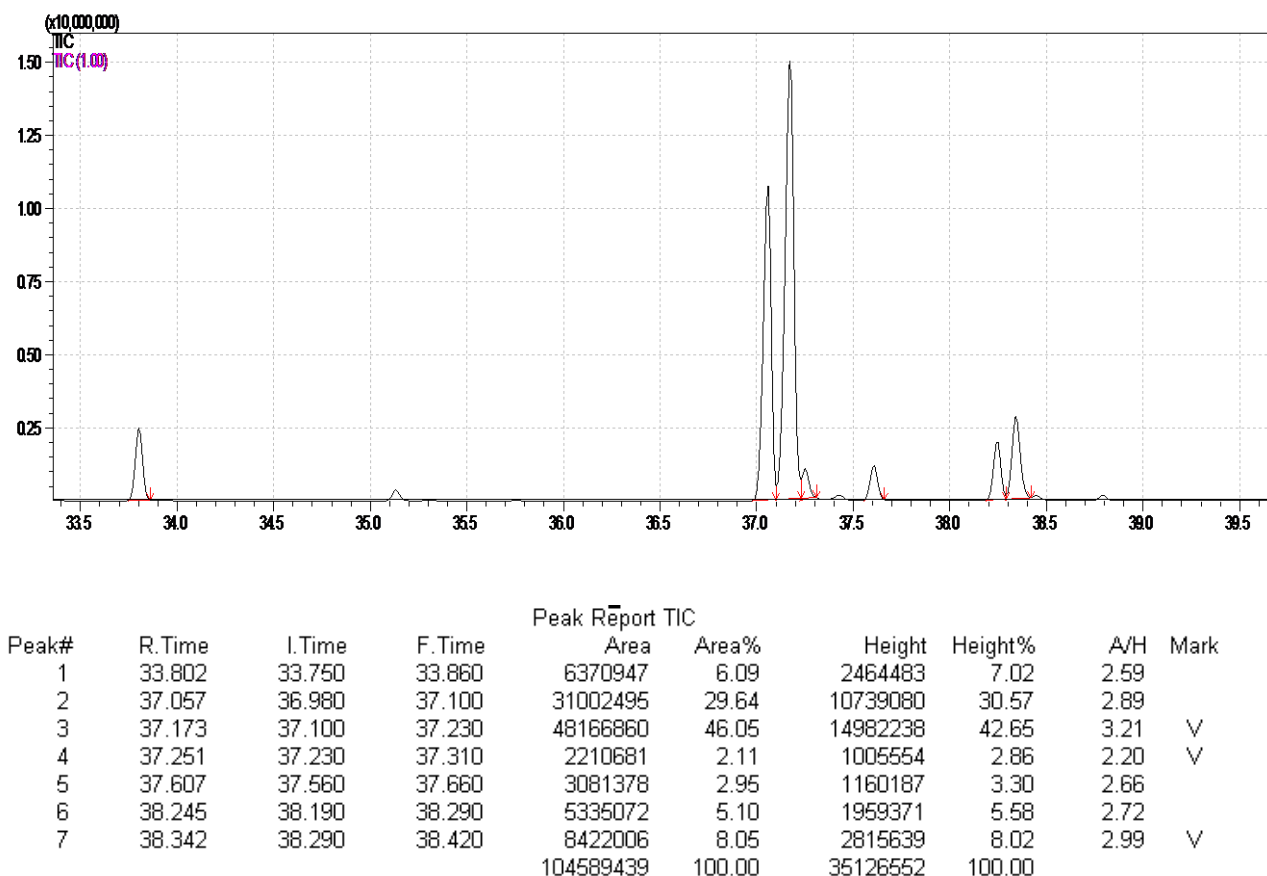


Figura 34. Cromatograma referente aos lipídios extraídos da biotransformação com a cepa *Penicillium* spp. (BR10) obtido após derivatização.

A identificação e quantificação dos principais ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção obtidos com biblioteca do equipamento. Nesta análise foram encontrados ésteres metílicos relacionados aos ácidos graxos em maior proporção o palmítico, linolênico, linoleico, oleico, esteárico, araquídico e eneicosanóico. A Tabela 14 apresenta o perfil dos ácidos graxos produzidos.

Tabela 14. Porcentagem do perfil dos ácidos graxos produzidos.

Fungo	Perfil dos ácidos graxos (%)						
	C16:0	C18:3	C18:2	C18:1	C18:0	C20:0	C21:0
<i>Aspergillus</i> spp.(FF5)	3,63	17,91	72,13	4,31	2,02	Nd	Nd
<i>Aspergillus</i> spp.(FF3)	3,02	15,61	74	4,89	2,49	Nd	Nd
<i>Penicillium</i> spp. (BR10)	6,09	29,64	46,05	2,11	2,95	5,1	8,05

Nd – Não detectado.

Nos ensaios de biotransformações analisados, os ácidos graxos majoritários produzidos pelos fungos selecionados foram o ácido linolênico (C18:3) e ácido

linoleico (C18:2), correspondendo a 90,04 % na cepa *Aspergillus* spp. (FF5), 89,61 % em *Aspergillus* spp.(FF3) e 75,69 % em *Penicillium* spp. (BR10). Em menor quantidade, se obteve o ácido palmítico (C16:0), ácido oleico (C18:1), ácido esteárico (C18:0), ácido araquídico (C20:0) e ácido eneicosanóico (C21:0).

Jingyang et al (2012) observou que os lipídios produzidos por microrganismos apresentam em sua composição principalmente os ácidos graxos: palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (18:2), linolênico (C18:3), que é semelhante a composição encontrada em óleos vegetais.

O óleo acumulado por fungos oleaginosos é mais insaturado do que o óleo produzido por leveduras. Esta é a principal razão pela qual os fungos oleaginosos são principalmente utilizados, a fim de produzir lipídios ricos em ácidos graxos poli-insaturados de interesse médico e dietético (PAPANIKILAOU; AGGELIS, 2011).

Segundo Silva et al. (1998) a temperatura é o principal regulador do grau de insaturações dos ácidos graxos produzidos. Em nosso trabalho, a temperatura utilizada nos ensaios de biotransformação foi de 25 °C sendo possível a identificação de altos níveis de PUFA's corroborando com os resultados dos estudos realizados por Miranti et al. (2017) que identificou 62,15% de ácidos graxos insaturados nos lipídios produzidos por *Aspergillus oryzae* através de fermentação submersa.

Em estudo realizado por Avedaño-Morales et al (2017) foi possível demonstrar a produção de lipídios por *Penicillium decubens* através do bagaço de alga marinha. Os ácidos graxos encontrados foram: mirístico (C14:0), miristoleico (C14:1), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolênico (C18:3), araquídico (C20:0) e docosanoíco (C21:0). O percentual médio observado para os PUFA's foi de 39% no total de lipídios produzidos.

6. CONCLUSÕES

- Das 51 cepas isoladas de *Aspilia graziellae* (Santos) testadas quanto à capacidade de sintetizar lipídios, dez apresentaram potencial na metabolização do glicerol como fonte de carbono e foram testadas no ensaio de biotransformação. Destas cepas, *Aspergillus* spp. (FF5), *Aspergillus* spp (FF3) e *Penicillium* spp. (BR10) foram capazes de produzir lipídios utilizando glicerol como fonte de carbono.
- O perfil dos ácidos graxos foi determinado pela análise de CG/MS, onde foi possível detectar os ácidos graxos majoritários: linolênico (C18:3) e linoleico (C18:2), correspondendo a 90,04 % na cepa *Aspergillus* spp.(FF5), 89,61 % em *Aspergillus* spp.(FF3) e 75,69 % em *Penicillium* spp. (BR10).
- Apesar dos altos níveis de PUFA's identificados nos lipídios produzidos pelas cepas selecionadas, o rendimento da biotransformação foi baixo, sendo em média 9,5% em *Aspergillus* spp. (FF5), 7,6 % em *Aspergillus* (FF3) e 14,25 % em *Penicillium* spp. Serão necessários estudos adicionais para avaliação de diferentes composições para o meio de cultura, quantidade mínima de esporos no inóculo, entre outras variáveis, visando otimizar a produção e principalmente o rendimento dos lipídios produzidos, além de estratégias de escalonamento, com a finalidade de se reduzir custos com a produção destes ácidos graxos.
- A utilização do glicerol como fonte de carbono para produção de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS) através de ensaios biotransformação deve ser considerada uma alternativa plausível para absorver e agregar valor ao excedente deste composto proveniente da indústria de biocombustíveis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFSETH N.K., KOHLER A. Extended multiplicative signal correction in vibrational spectroscopy, a tutorial. *Chemom Intell Lab Syst.* v.117, p. 92–99, 2012
- AMANULLAH A.; MCFARLANE C. M.; EMERY A. N., NIENOW A. W. Scale-down model to simulate spatial pH variations in large-scale bioreactors. *Biotechnol Bioeng.* v.73, p. 390–399, 2001.
- BEATRIZ, A.; ARAUJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. *Quím. Nova*, v. 34, p. 306-319, 2011.
- BEOPOULOS, A.; NICAUD, J. M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeast and its impact on biotechnological processes. *Appl. Microb. and Biotech.*, v. 10, p. 1193-1203, 2011.
- BILGEN, S.; KELES, S.; KAYGUSUZ, A.; SARI, A.; KAYGUSUZ, K. Global warming and renewable energy sources for sustainable development: A case study in Turkey. *Renew. Sust. Energ.Rev*, v. 12, n. 2 , p.372-396, 2008.
- BLIGH, E. G ; DYER, W. J.; A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. Jour. of Biochem. and Physio*, v. 37, p. 911, 1959.
- BRASIL, Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). 2016.
- BREITMAYER, E. Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry: A Practical Guide. 3rd ed. Germany. John Wiley & Sons, Ltd. 2002.
- BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D´ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Quím. Nov.*, São Paulo, v. 32, n. 4, p.849-854, 2009.
- BURKERT, J. C. A. V. Evaluation of the composition of culture medium for yeast biomass production using raw glycerol from biodiesel synthesis. *Bra. Jour. of Microbio.*, v. 43, n. 2, p. 432-440, 2012.
- CANTORAL, J.M.; DIEZ, B.; BARREDO, J.L.; ALVAREZ, E. and MARTIN, J.F. High-frequency transformation of *Penicillium chrysogenum*. *Bio/Technology*, v. 5, n. 5, p. 494-497, 1987.
- CARDOSO, B. F.; SHIKIDA, P. F. A.; FINCO, A. Análise Fatorial do Sistema Agroindustrial do Biodiesel no Brasil e na União Europeia. *Rev. Econ. Sociol. Rural*, Brasília , v. 55, n. 3, p. 551-568, 2017
- CHATZIFRAGKOU, A.; MAKRI, A.; BELKA, A.; BELLOU, S.,; MAVROU, M.; MASTORIDOU, M.; MYSTRIOTI, P.; ONJARO, G.; AGGELIS, G.; PAPANIKOLAOU, S.; Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*, v.36 p.1097–108, 2011.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-production fungi from Brazil savanna soil. *World Jour. of Microbio. & Biotech.*, v.22, p.881-885, 2005.

CREMONEZ, P. A.; FEROLDI, M.; OLIVEIRA, C. J.; TELEKEN, J. A.; ALVES, H. J.; SAMPAIO, S. C. Environmental, economic and social impact of aviation biofuel production in Brazil. *New Biotech.*, vol. 32, n. 2, p. 263-271. 2015.

CZABANY T.; ATEHENSTAEDT, K.; DAUM, G. Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1771, p.299-309, 2007.

DIAZ, J.C.M.; RODRÍGUEZ, S.; ROUSSOS, J.; CORDOVA, A.; ABOUSALHAM.; CARRIÈRE, F.; BARATTI, J. Lipases from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enz. Microbi. Tech.*, v. 39, p. 1042-1050, 2006.

DISHISHA, T.; PEREYRA, L. P.; PYO, S.; BRITTON, R. A.; HATTI-KAUL, R. Flux analysis of the *Lactobacillus reuteri* propanediol-utilization pathway for production of 3-hydroxypropionaldehyde, 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol. *Microbial Cell Facto.*, vol. 13, n. 76, p. 1-10. 2014.

DOBROWOLSKI, A.; MITULA, P.; RYMOWICZ, W.; MIRONCZUK, A.M. 2016. Efficient conversion of crude glycerol from various industrial wastes into single cell oil by yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bio. Tech.*, v. 207, p. 237-243, 2016.

ELINDERF.;LIIN S. I. Actions and mechanisms of polyunsaturated fatty acids on voltage-gated ion channels. *Frontiers in Physio.*, v8, p. 1-4, 2017.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200. 2016.

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

FREDMAN G.; TABAS, I. Boosting inflammation resolution in atherosclerosis: the next frontier for therapy, *Am. J. Pathol.* v.187, p.1211 –1221, 2017.

GEISER D.M., KLICH M.A., FRISVAD J.C., PETERSON S.W., VARGA J., SAMSON R.A. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud Mycol* v. 59, p. 1–10, 2007.

GILL, C.; HALL, M.; RATLEDGE, C. Lipid accumulation in an oleaginous yeast with possession of ATP: citrate lyase. *Appl. Envir. Microbiol.*, v.33, p. 231-239, 1977.

GUILLÉN, M. D.; RUIZ, A. Rapid simultaneous determination by proton NMR of unsaturation and composition of acyl groups in vegetable oils, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, v.105, p.688-696, 2003.

HÁJEK, M.; SKOPAL, F. Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production. *Biores. Technol.*, Oxon, v. 101, n. 9, p. 3242-3245, 2010.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl from lipids. *Lab. Pract.*, London, v. 22, n. 3, p. 475-473, 1973.

HE, Q. S.; MCNUTT, J.; YANG, J. Utilization of the residual glycerol from biodiesel production for renewable energy generation. *Renew. and Sustain. Energy Reviews*, v. 71, p. 63–76, 2017.

HEJNA, A.; KOSMELA, P.; FORMELA, K.; PISZCZYK, L.; HAPONIUK, J.T.; Potential applications of crude glycerol in polymer technology—current state and perspectives. *J Renew. Sustain. Energy*. v. 66, p. 449–75.

HOU, C. T. Handbook of Industrial Biocatalysis. Taylor & Francis Group. United States of America. 2005.

HU, S.; LUO, X.; WAN C.; Y. LI. Characterization of crude glycerol from biodiesel plants. J. Agric. Food Chem., v.60, p. 5915-5921, 2012.

I.M. Berquin, I.J. Edwards, Y.Q. Chen, Multi-targeted therapy of cancer by omega- 3 fatty acids, Cancer Lett. v. 269, p. 363 –377, 2008.

ITO, F. M. Síntese, Biotransformação e Avaliação Biológica de Substâncias Policíclicas Cage-Like Derivadas do Aduto de Diels-Alder Triciclo[6.2.1.0.2,7]undeca-4,9-dien-3,6-diona. 2007. Dissertação de mestrado (Mestrado em Química), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2007.

ITO, F. M.; MENA, A. E. M.; MARQUES, M. R.; LIMA, D. P.; BEATRIZ, A. Biotransformation of a Cage-Like Diels-Alder adduct and derivatives by *Mucor ramosissimus*. Brazilian Journal of Microbiology, v. 40, p. 563-568, 2009.

JINGYANG, X. U.; WEI, D. U.; XUEBING, ZHAO.; GUOLING, ZHANG.; DEHUA, LIU. Review. Microbial oil production from various carbon sources and its use for biodiesel preparation. Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing, P.R. China, 2012.

KAMPE, P.; GIEBELDER, L.; SMUELIS, D.; KUNERT, J.; DROCHNER, A.; HAASS, F.; ADAMS, A. H.; OTT, J.; ENDRES, S.; SHIMANKE, G.; BUHRMESTER, T.; MARTIN, M.; FUESS, H.; VOGEL, H. Heterogeneously catalysed partial oxidation of acrolein to acrylic acid - structure, function and dynamics of the VMo-W mixed oxides. Physical Chemistry Chemical Physics, v. 9, p. 3577-3583, 2007.

KOSA, G.; ZIMMERMAN, B.; KOHLER, A.; EKEBERG, D.; AFSETH, N. K.; MOUNIER, J.; SHAPAVAL, V. High-throughput screening of *Mucoromycota* fungi for production of low and high-value lipids. Biotechnol Biofuel v.11, p. 66-83, 2018.

LANE, K.E., DERBYSHIRE, E.J. Omega-3 fatty acids – a review of existing and innovative delivery methods. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., v. 9, p. 1–8, 2015.

LEE J. M.; LEE H.; KANG S.; PARK W. J. Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances. Nutrients. v. 8, p. 23-30, 2016.

LI, N.; DENG, Z. N.; QIN, Y. L.; CHEN, C. L.; LIANG, Z. Q. Production of polyunsaturated fatty acids by *Mucor recurvus* sp. with sugarcane molasses as the carbon source. Food Technol. Biotechnol., v.46, p.73-79, 2008.

LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. Appl. Microbiol. Biotech., v. 80, p. 749–756, 2008.

LIDE, D. R. Handbook of Chemistry and Physics, 87th ed., Taylor and Francis Group: Boca Raton, 2006.

LIEBMINGER, S.; HOFBAUER, R.; SIEBENHOFER, M.; NYANHONGO, G. S.; GUEBITZ, G. M. Microbial conversion of crude glycerol to dihydroxyacetone. Waste Biomass Value, v. 5, p. 781-787, 2014.

LILLY V.G.; BARNETT H.L. Physiology of fungi. New York: McGraw Hill Book Company Inc., p. 464. 1951

MOGHADASIAN M., Advances in dietary enrichment with N- 3 fatty acids, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. v. 48, p.402 –410, 2008.

GARG M.L.; WOOD L.G.; SINGH, P.J. Moughan Means of delivering recommended levels of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in human diets J. Food Sci., v.71 , p. 66–71, 2006.

MAGALHÃES, K. F. Estudo espectroscópico do biodiesel: Identificação dos cromóforos e fluoróforos e contribuição dessas moléculas no monitoramento da degradação termo-oxidativa. Tese de doutorado. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS. Campo Grande, 2016.

MAKRI, A.; FAKAS, S.; AGGELIS, G. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Bioresource Technol.*, v. 101, p. 2351–2358, 2010.

MARQUES, M. R. Interação entre uma endopoligalacturonase de *Mucor ramosissimus* (Mucorales) e a pectina da parede de celular de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) na indução de respostas de defesa de plantas. Tese. (Doutorado em Bioquímica), Universidade Federal do Estado de São Paulo, São Paulo, 1998.

MELIN, P.; STRATFORD, M.; PLUMRIDGE, A.; ARCHER, D. A. Auxotrophy for uridine increases the sensitivity of *Aspergillus niger* to weak-acid preservatives. *Microbiology*, vol. 154, p. 1251-1257, 2008.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécie de gênero *Colletotrichum*. *Fitopatologia brasileira*, Brasília, v.27, p.23-27, 2002.

MICHA, R., and MOZAFFARIAN, D. Trans fatty acids: effects on metabolic syndrome, heart disease and diabetes. *Nat. Rev. Endocrinol.*, v. 5, p. 335–344, 2009.

MILINSK, M. C.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J. V.; DIAS, L. F.; YAMAGUCHI, M. M.; PEDRÃO, M. R.; SOUZA, N. E. Influence of the esterification method on the quantification of oil fatty acids. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 32, n. 2, p. 139-150, 2011.

MITREA, L.; TRIF, M.; CATOI, A.F.; VODNAR, D.C. Utilization of biodiesel derived-glycerol for 1,3-pd and acid citric production. *Microbial Cell Factories* v.16, p.1-17, 2017.

RUBIO-RODRÍGUEZ N.; BELTRÁN S.; JAIME I.; DE DIEGO S. M.; SANZ M. T.; CARBALLIDO J .R. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: a review, *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* v.11, p.1 –12, 2010.

NAKAMURA, C. E.; WHITED, G. M. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr. Opin. Biotechnol.* v. 14, p. 454-459, 2003.

NAVARRO, C. M. E. Otimização de um meio de cultura para produção de *Candida utilis* a partir do glicerol. 1996. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1996.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed. USA. W. H. Freeman & Company, 2004.

OMOIFO, C. O. *Rhizopus stolonifer* exhibits dimorphism. *African Journal of Biotechnology*. v. 10, n. 20, p. 4269-4275, 2011.

PAPANIKOLAOU, S.; RONTOU, M.; BELKA, A.; ATHENAKI, M.; GARDELI, C.; MALLOUCHOS, A.; KALANTZI, O.; KOUTINAS, A. A.; KOOKOS, I.K.; ZENG, A. P.; AGGELIS, G. Conversion of biodiesel-derived glycerol into biotechnological products of industrial significance by yeast and fungal strains. *Eng Life Sci.* v.17, p. 262–81. 2017.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.113, n. 8, p.1031-1051, 2011.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. *Introduction to Spectroscopy – A guide for students of Organic Chemistry*. 3rd ed. Thompson Learning, United States of America. 2001.

- PENG, X. W.; CHEN, H. Z. Microbial oil accumulation and cellulose secretion of the endophytic fungi from oleaginous plants. *Annls of Microbiol.*, v.57, p.239-242, 2007.
- RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, v. 86, p. 807-815, 2004.
- RATLEDGE, C. Yeast, moulds, algae and bacteria as source of lipids. In: KAMEL, B. S. and KAKUDA, Y. *Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids*. London: Blackie Academic and Professional, cap. 9, p. 235-291, 1994.
- REYES-DOMINGUEZ, Y.; BOEDI, S.; SULYOK, M.; WIESENBERGER, G.; STOPPACHER, N.; KRSKA, R.; STRAUSS, J. Heterochromatin influences the secondary metabolite profile in the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 49, p. 39-47, 2012.
- RIVALDI, J. D.; SARROUB, B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S. Glicerol de biodiesel. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 37, 2007.
- SEIP, J.; JACKSON, R.; HE, H.; ZHU, Q.; HONG, S. P. Snf1 Is a regulator of lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 79, n. 23, p. 7360-7370, 2013.
- SILVA, G. K. B. Produção de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) por *cunninghamella elegans* ucp 542 em substratos alternativos. 2011. 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.
- SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotech. Advan.*, v. 27, p. 30-39, 2009.
- SILVA, M.; MAFIO, G.P.; CANHOS, V.P. Characterization of selected strains of mucorales using fatty acid profile. *Rev. Microbiol.*, v. 29, p. 276-281, 1998.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G.; MORRIL, T. C. *Identificação Espectométrica de Compostos Orgânicos*. 5ª ed. Guanabara Koogan, 1994.
- SITEPU, I. R.; SESTRIC, R.; IGNATIA, L.; LEVIN, D.; GERMAN, J. B.; GILLIES, L. A.; ALMADA, L. A. G.; BOUNDY-MILLS, K. L. Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. *Biores. Technol.*, v. 144, p. 360–369, 2013.
- SPIER, F. Produção de lipídios microbianos a partir de glicerol bruto gerado na síntese de biodiesel. Tese de doutorado (Doutorado em Engenharia de Processos). Universidade Federal do Rio Grande – UFRG. Rio Grande, 2015.
- TONATO, D. Seleção de fungos filamentosos para produção de ácidos graxos poli-insaturados. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2015.
- VENKATA-SUBHASH, G & VENKATA- MOHAN, S. Lipid accumulation for biodiesel production by oleaginous fungus *Aspergillus awamori*: Influence of critical factors. *Fuel*, v.116, p. 509-515, 2014.
- VIÊGAS, C. V. Extração e caracterização dos lipídeos da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de ésteres graxos. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande – UFRG. Rio Grande, 2010.
- WANG, Z. P.; XU, H. M.; WANG, G. Y.; CHI, Z.; CHI, Z. M. Disruption of the MIG1 gene enhances lipid biosynthesis in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids.*, v. 1831, p.675-682, 2013.

WATANABE, N.; OTA,Y.; MINODA,Y.; YAMADA C.Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. *Agricul. and Biol. Chem.*, v. 41, p.1353-1358. 1977.

YKEMA, A.; VERBREE, E. C.; VERSEVELD, H. W.; SMIT, H. Mathematical modeling of lipid production by oleaginous yeasts in continuous cultures. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 52, p. 491-506, 1986.