

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE  
PROCESSOS**

**Simara Somacal**

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS POR  
FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

Santa Maria, RS, Brasil  
2015

**Simara Somacal**

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS POR  
FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Área de Concentração em Desenvolvimento de Processos Agroindustriais e Ambientais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia de Processos**.

**Orientador: Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti**  
**Coorientadora: Prof. Dra. Raquel Cristine Kuhn**

Santa Maria, RS, Brasil  
2015

**Simara Somacal**

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS POR  
FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Área de Concentração em Desenvolvimento de Processos Agroindustriais e Ambientais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia de Processos**.

**Aprovado em 17 de dezembro de 2015:**

\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti, (UFSM)**  
**(Presidente/Orientador)**

\_\_\_\_\_  
**Prof. Dra. Raquel Cristine Kuhn, (UFSM)**  
**(Coorientadora)**

\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Cristiano Ragagnin de Menezes, (UFSM)**

\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Evandro Stoffels Mallmann, (UNIFRA)**

Santa Maria, RS  
2015.

## **DEDICATÓRIA**

**A minha irmã Sabrina, por todo amor  
dedicação e incentivo...**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, que sempre iluminou meus caminhos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti, pela oportunidade concedida, pela confiança em mim depositada, e pela pessoa humana, incentivador e dedicado, grata pela orientação.

A minha querida co-orientadora, Prof. Dr. Raquel Kuhn, pela paciência, incentivo e dedicação que resultou em uma amizade ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Roger Wagner pelo empréstimo e confiança na utilização de seu laboratório e pela contribuição para realização deste trabalho.

A Raquel Vendruscolo pela disponibilidade em me ajudar nas análises de cromatografia e pela amizade.

Aos meus pais Suelir e Eduvar por todo amor verdadeiro e apoio em todos os momentos, porque sempre acreditaram na minha capacidade.

A minha filha Sofia que é meu orgulho, minha vida, meu amor infinito.

Ao meu namorado Jilvani, pelo amor incondicional, incentivo, carinho, paciência e pela força diária que necessitei em todos os momentos nessa caminhada.

A minha irmã Sabrina, que sempre estava à disposição para me ajudar, é a minha fonte de admiração, inspiração e perseverança, pelo belo exemplo de pesquisadora e dedicação em tudo que faz.

Aos colegas da Pós-Graduação em Engenharia de Processos.

A todos que, de alguma forma, direta ou indireta, colaboraram na realização deste trabalho e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer o meu agradecimento.

Agradeço a CAPES e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Agradeço a UFSM e a PPGepro pela estrutura física disponibilizada.

## RESUMO

### PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

AUTOR: Simara Somacal

ORIENTADOR: Dr. Marcio Antonio Mazutti

COORDENADOR: Dra. Raquel Cristine Kuhn

O objetivo deste trabalho foi produzir ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) por fermentação submersa a partir do fungo *Mortierella isabellina*. Um planejamento experimental Plackett Burman foi delineado para avaliar as melhores condições para produção de PUFAS em frascos agitados. Foram avaliados três diferentes componentes do meio de cultura (extrato de levedura, peptona e sacarose) e três parâmetros de fermentação (agitação, temperatura e pH). Através dos resultados obtidos no planejamento experimental, novos ensaios foram definidos com o aumento da concentração de extrato de levedura. As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyers com 10% de inoculo (v/v) durante 120h e a composição de micronutrientes ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) foi mantida fixa. Na melhor condição definida em frascos agitados foi realizada a ampliação da fermentação para biorreator STR, com 2,5 L de meio de cultura e 10 % de inoculo (v/v) durante 120h. Um delineamento composto central 2<sup>2</sup> foi definido para avaliar o efeito das variáveis agitação e aeração na produção de biomassa fúngica, lipídeos e no perfil dos ácidos graxos. A fração lipídica foi extraída a partir da biomassa seca da fermentação e os ácidos graxos foram analisados por cromatografia em fase gasosa. Os resultados da fermentação em frascos agitados demonstraram que somente a variável extrato de levedura teve efeito significativo (p<0,1) na produção de PUFAs sendo este efeito positivo. O maior percentual de PUFAs produzidos (28,17%) foi obtido na maior concentração de extrato de levedura (3,75 g/L). Os resultados obtidos na fermentação em biorreator demonstraram que as variáveis agitação e aeração não foram estatisticamente significativas (p<0,1) para o acúmulo de PUFAs e lipídeos dentro das faixas avaliadas. Entretanto a agitação teve efeito significativo positivo na produção de biomassa. Foi observada a presença dos ácidos graxos da família n-3 (ácido α-linolênico, ácido eicosapentaenóico e ácido docosaexaenóico) e da família n-6 (ácido linoléico e o ácido γ-linolênico). Em vista dos resultados obtidos, pode-se concluir que a fonte de nitrogênio esta diretamente relacionada com o aumento da produção de PUFAs. As variáveis agitação e aeração nas faixas avaliadas não influenciaram no acúmulo de PUFAs. A *Mortierella isabellina* produziu ácidos graxos da família n-3 e n-6, entretanto estudos adicionais devem ser realizados para otimizar esta produção.

Palavras-chave: ácidos graxos poli-insaturados. Óleo microbiano. *Mortierella isabellina*. fermentação submersa.

## ABSTRACT

### POLYUNSATURATED FATTY ACIDS PRODUCTION BY SUBMERGED FERMENTATION

AUTHOR: Simara Somacal  
ADVISOR: Dr. Marcio Antonio Mazutti  
COADVISOR: Dra. Raquel Cristine Kuhn

The objective of this work was the polyunsaturated fatty acids (PUFAs) production by submerged fermentation from the fungus *Mortierella isabellina*. A Plackett Burman experimental design was designed to evaluate the best conditions for PUFAs production in shake flasks. Three different components of the culture medium (yeast extract, peptone, and sucrose) and three fermentation parameters (agitation, temperature and pH) were evaluated. Analyzing the results of experimental design new assays were performed with increasing concentration of yeast extract. Fermentations were conducted in Erlenmeyer flasks with 10% (v/v) inoculums for 120h, micronutrients ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) were fixed. The scale up using STR bioreactor with 2.5 L of culture medium and 10% (v/v) inoculums for 120h was defined through better results of Plackett Burman.. A 2<sup>2</sup> central composite design was set to evaluate the effect of agitation and aeration in fungal biomass production, lipids content and fatty acids profile. The lipid was extracted from dried biomass and the fatty acids were analyzed by gas chromatography. The results of the fermentation in shake flasks showed that only yeast extract had a significant effect (p <0.1) in PUFAs production and this effect was positive. The highest percentage of PUFAs produced (28.17%) was obtained in higher yeast extract concentration (3.75 g / L). Agitation and aeration did not had a significance effect (p <0.1) in the evaluated range, in bioreactor on PUFAs and lipids production. However, agitation had a significant positive effect on biomass production. The presence of fatty acids of family n-3 (α-linolenic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid) and n-6 families (linoleic acid and γ-linolenic acid) were observed. Nitrogen source is directly related to increased PUFAs production. The variables agitation and aeration, in the evaluated range, did not influence the PUFAs production. The *Mortierella isabellina* produced fatty acids n-3 and n-6 family, but additional studies are needed to optimize this production.

**Keywords:** polyunsaturated fatty acids. Microbial oil. *Mortierella isabellina*. submerged fermentation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Estrutura química dos principais PUFAs n-3 e n-6.....   | 16 |
| Figura 2 - Metabolismo dos ácidos graxos essenciais .....  | 17 |
| Figura 3 – Mortierella sp e Mortierella isabelina .....  | 27 |
| Figura 4 - Gráfico de Pareto demonstrando o efeito de cada variável sobre a produção de lipídeos após 120 h de fermentação em agitador orbital ..... | 37 |
| Figura 5 - Gráfico de Pareto demonstrando o efeito das variáveis na produção de SFA após 120 h de fermentação em agitador orbital. ....              | 38 |
| Figura 6 - Gráfico de Pareto demonstrando o efeito das variáveis na produção de MUFAs após 120 h de fermentação em agitador orbital. ....            | 38 |
| Figura 7 - Gráfico de Pareto demonstrando o efeito das variáveis na produção de PUFAs após 120 h de fermentação em agitador orbital .....            | 39 |
| Figura 8 - Produção de lipídios e biomassa ao longo das 120 horas de fermentação .....   | 44 |
| Figura 9 - Gráfico de Pareto demonstrando o efeito das variáveis na produção de biomassa após 120 h de fermentação em biorreator STR. ....           | 46 |
| Figura 10 - Gráfico de Pareto demonstrando o efeito das variáveis na produção de lipídeos totais após 120 h de fermentação em biorreator STR.....    | 47 |
| Figura 11 - Gráfico de Pareto demonstrando o efeito das variáveis na produção de SFA após 120 h de fermentação em biorreator STR.....                | 47 |
| Figura 12 - Gráfico de Pareto demonstrando o efeito das variáveis na produção de MUFAs após 120 h de fermentação em biorreator STR.....              | 48 |
| Figura 13 - Gráfico de Pareto expressando os efeitos das variáveis independentes na concentração de PUFAs .....                                      | 49 |



## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Composição de PUFAS (g/100g de óleo) em diferentes tipos de óleos vegetais e animais. ....   | 19 |
| Tabela 2 - Ácidos graxos da família n-3 e n-6 e suas fontes naturais. ....  | 20 |
| Tabela 3 - Quantidade de lipídeos acumulados por diferentes espécies de micro-organismos. ....  | 24 |
| Tabela 4 - Composição dos ácidos graxos de óleo microbiano. ....  | 25 |
| Tabela 5 - Matriz experimental do planejamento do tipo Plackett-Burman, variáveis codificadas e reais entre parênteses, acúmulo de lipídeos e perfil de AG produzidos após 120 h de fermentação. .... | 36 |
| Tabela 6 - Perfil dos ácidos graxos obtidos nos experimentos do planejamento Plackett-Burman. ....  | 41 |
| Tabela 7 - Influência das diferentes concentrações de extrato de levedura no acúmulo de lipídeos, e AG (SFA, MUFAs e PUFAs). ....   | 42 |
| Tabela 8 - Perfil de AG obtidos nas diferentes concentrações de extrato de levedura. ....   | 43 |
| Tabela 9 - Matriz experimental para avaliar a influência da agitação e aeração na produção de PUFAs após 120h de fermentação em biorreator STR. ....  | 45 |
| Tabela 10 - Perfil dos ácidos graxos obtidos no delineamento composto central 2 <sup>2</sup> (DCC). ....  | 50 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                    |  |
|--------------------|--|
| PUFAs              | ácidos graxos poli-insaturados (polyunsaturated fatty acids) |
| DCV                | doenças cardiovasculares                                     |
| EPA                | ácido eicosapentaenóico                                      |
| DHA                | ácido docosaexaenóico  |
| SFA                | ácidos graxos saturados (saturated fatty acids)              |
| AG                 | ácidos graxos  |
| n-3                | ômega-3  |
| n-6                | ômega-6  |
| LA                 | ácido linoléico  |
| ALA                | ácido alfa-linolênico  |
| UFA                | ácidos graxos insaturados (unsaturated fatty acids)          |
| MUFAs              | ácidos graxos monoinsaturados (monounsaturated fatty acids)  |
| AA                 | ácido araquidônico   |
| GLA                | ácido $\gamma$ -linolênico                                   |
| DPA                | ácido docosapentaenóico                                      |
| n-9                | ácido oléico   |
| C/N                | carbono/nitrogênio   |
| BDA                | Agar batata dextrose (potato dextrose Agar)                  |
| BD                 | batata dextrose (potato dextrose)                            |
| DCC                | delineamento composto central                                |
| M                  | molar  |
| FAME               | ésteres metílicos de ácidos graxos                           |
| h                  | horas  |
| $\alpha$           | alfa   |
| $\gamma$           | gama   |
| $^{\circ}\text{C}$ | graus Celsius  |
| $\text{g/L}^{-1}$  | gramas por litro   |
| rpm                | rotações por minuto  |
| vvm                | volume de ar por volume de meio, por minuto                  |
| $\Sigma$           | somatório  |
| L                  | litros   |

## SUMÁRIO

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1.      | INTRODUÇÃO.....  | 12 |
| 2.      | OBJETIVOS.....   | 14 |
| 2.1     | OBJETIVO GERAL.....  | 14 |
| 2.2     | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 14 |
| 3.      | REVISÃO DA LITERATURA.....   | 15 |
| 3.1     | ÁCIDOS GRAXOS.....   | 15 |
| 3.1.1   | IMPORTÂNCIA DOS AG PARA A SAÚDE HUMANA .....                               | 17 |
| 3.1.2   | FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS.....                                    | 19 |
| 3.2     | MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE LIPÍDEOS .....                              | 20 |
| 3.2.1   | FUNGOS PRODUTORES DE LIPÍDEOS.....   | 22 |
| 3.2.1.1 | <i>MORTIERELLA ISABELINA</i> .....   | 26 |
| 3.2.2   | METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS E IDENTIFICAÇÃO DE AG .....          | 28 |
| 3.3     | FERMENTAÇÃO SUBMERSA .....   | 30 |
| 4.      | MATERIAL E MÉTODOS .....   | 32 |
| 4.1     | MICRO-ORGANISMO .....  | 32 |
| 4.2     | FERMENTAÇÃO EM AGITADOR ORBITAL.....                                       | 32 |
| 4.3     | CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA BIOMASSA E ACÚMULO DE LIPÍDEOS.....             | 33 |
| 4.4     | FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR STR .....  | 33 |
| 4.5     | SEPARAÇÃO DA BIOMASSA E EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS .....                         | 33 |
| 4.6     | DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS .....  | 34 |
| 5       | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 35 |
| 5.1     | FERMENTAÇÃO EM AGITADOR ORBITAL.....                                       | 35 |
| 5.1.1   | AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA NA PRODUÇÃO DE PUFAS..... | 42 |
| 5.1.2   | CINÉTICA DE CRESCIMENTO.....   | 44 |
| 5.2     | FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR STR .....  | 45 |
|         | CONSIDERAÇÕES FINAIS .....   | 51 |
|         | SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....                                     | 52 |
|         | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 53 |

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas inúmeros estudos científicos vêm destacando a importância dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) para a saúde humana. Alguns dados demonstram que 84% das doenças cardiovasculares (DCV) estão associadas à baixa taxa de consumo de PUFAs, principalmente o ácido eicosapentanóico (EPA) e o ácido docosahexanóico (DHA) (JACKOWSKI et al., 2012). Uma vez que as DCV são a principal causa de morte no mundo, perfazendo 30% das mortes globais, diversas estratégias dietéticas tem sido propostas com o intuito de reduzir o consumo de ácidos graxos saturados (SFA) em favor ao aumento na ingestão de PUFAs (YATES et al., 2014; SEKIKAWA et al., 2015).

Os PUFAs são constituintes das células, exercem funções estruturais, energética e são precursores de uma variedade de reguladores biologicamente ativos, por exemplo, hormônios e moléculas sinalizadoras, que realizam diversas funções fisiológicas no metabolismo celular. Alguns PUFAs são considerados essenciais, pois não são produzidos pelo organismo, necessitando ser ingeridos através dos alimentos. Essa classe de ácidos graxos (AG) essenciais abrange as famílias do ômega-6 (n-6) e do ômega-3 (n-3), tais como ácido linoléico (LA) e  $\alpha$ -linolênico (ALA), respectivamente (CLEMENTE et al., 2007). Nos últimos anos, o consumo de n-3 e n-6 está ganhando cada vez mais atenção devido aos seus efeitos na saúde humana e suas aplicações farmacêuticas emergentes (ZHAO et al., 2015).

Os AG n-6 são facilmente encontrados em uma grande variedade de óleos vegetais, especialmente no de milho, algodão, soja, gergelim, girassol e canola. Quanto aos n-3, a principal fonte natural é o óleo de peixes de águas frias e, em menor proporção e qualidade, também pode ser encontrado no óleo de algumas oleaginosas como a linhaça (ETHIER, 2010). A longo prazo o óleo de peixe marinho não será capaz de atender à demanda crescente por este ácido graxo, tendo em vista que a população de peixes poderá diminuir drasticamente ou até mesmo desaparecer devido à pesca exploratória e as crescentes mudanças climáticas. Além disso, a obtenção do óleo de peixe apresenta alguns inconvenientes, como odor não atrativo, contaminação, instabilidade e custo elevado de purificação (WEN; CHEN, 2001). Desta forma,

a produção de PUFA's por rotas alternativas, como a biotecnológica, tem atraído um grande interesse nos últimos anos (VADIVELAN; VENKATESWARAN, 2014).

Pesquisas relacionadas à produção de lipídeos utilizando fungos e leveduras por fermentação submersa têm crescido nos últimos anos. Algumas espécies de fungos podem produzir até 40% de sua biomassa em lipídeos (VADIVELAN; VENKATESWARAN, 2014) e se destacam aqui algumas cepas pertencentes ao gênero *Mortierella* que são conhecidas na literatura por produzirem elevada quantidade de AG.

A produção do óleo microbiano, por via biotecnológica, possui vantagens, como a disponibilidade de matérias-primas em grande quantidade e de baixo custo, menor influência do meio ambiente, estação e clima e a possibilidade de aumentar a sua escala de produção de acordo com a demanda do mercado (POLI et al., 2014). Assim, o principal desafio na produção de um óleo microbiano rico em AG é a seleção do micro-organismo produtor e das condições que favoreçam a produção de uma grande quantidade de biomassa que apresente alto rendimento de PUFA's (n-3 e n-6) (LI et al., 2008; ECONOMOU et al., 2011).

Esta dissertação está composta por uma introdução que discute de maneira geral a importância dos ácidos graxos poli-insaturados. Uma revisão da literatura sobre ácidos graxos, importância, principais fontes, obtenção a partir de micro-organismos principalmente fungos e diferentes formas de condução do processo. Uma metodologia que descreve os procedimentos realizados para a produção e caracterização do óleo microbiano. E os principais resultados obtidos neste trabalho bem como as principais conclusões e sugestões para trabalho futuros.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal foi produzir PUFAs por fermentação submersa a partir do fungo *Mortierella isabellina*

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Definir as melhores condições de cultivo (composição do meio, pH, temperatura e agitação) para a produção de PUFAs em frascos agitados;
- ✓ A partir das condições selecionadas na etapa de produção em frascos agitados, avaliar os efeitos da agitação e da aeração na produção dos PUFAs em biorreator do tipo STR com volume útil de 3L.
- ✓ Caracterização do perfil de AG do óleo microbiano.

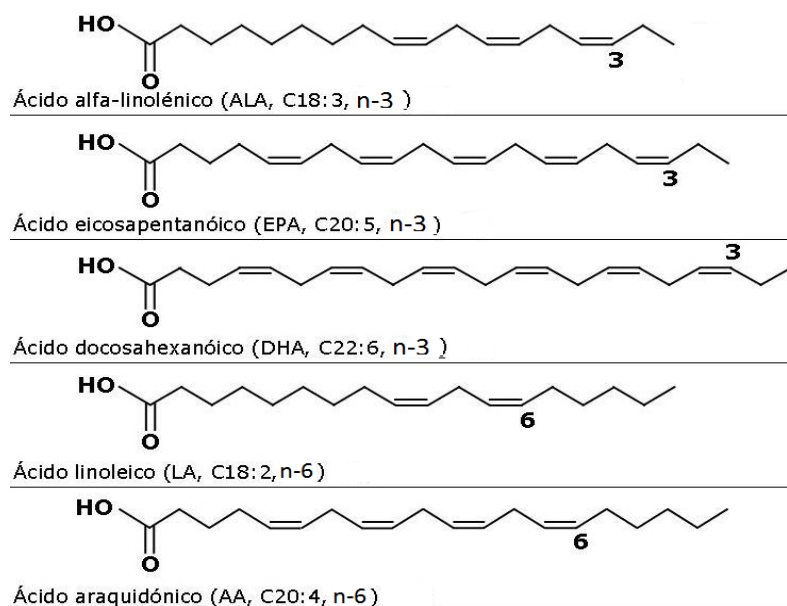
### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 ÁCIDOS GRAXOS

Óleos e gorduras têm um papel fundamental na alimentação humana. Além de fornecerem calorias, agem como veículo para as vitaminas lipossolúveis, como A, D, E e K. Os componentes lipídicos, especialmente os AG, estão presentes nas mais diversas formas de vida, desempenhando importantes funções na estrutura das membranas celulares e nos processos metabólicos. Esses componentes lipídicos são compostos orgânicos formados por uma cadeia de hidrocarbonetos e um grupo carboxílico que está normalmente ligada a um glicerol formando um acilglicerídeo (mono-, di- ou triglicerídeo). De acordo com o tipo da cadeia carbonada os AG podem ser classificados em saturados (SFA) ou insaturados (UFA), que por sua vez podem ser mono-insaturado (MUFAs) ou poli-insaturados (PUFAs) (RUBIO-RODRÍGUEZ et al., 2010).

A maioria dos PUFAs podem ser sintetizados pelos mamíferos através do sistema enzimático ácido graxo sintase, elongase e dessaturase, porém existe um grupo de PUFAs – denominado como ácido graxos essenciais - que o corpo humano não consegue produzir e que deve ser suprido pela dieta. Esse grupo é composto por duas famílias de AG: a série ômega-3 e a série ômega-6. As famílias de AG n-3 e n-6 contêm de 18 a 22 carbonos e a designação de ômega tem relação com a posição da primeira dupla ligação, contando a partir do grupo metílico localizado ao final da molécula do ácido graxo (carbono ômega). Os AG n-3 apresentam a primeira dupla ligação entre o terceiro e o quarto átomo de carbono, enquanto os AG n-6 têm a primeira dupla ligação entre o sexto e o sétimo átomo de carbono (Figura 1) (CARVALHO et al., 2003).

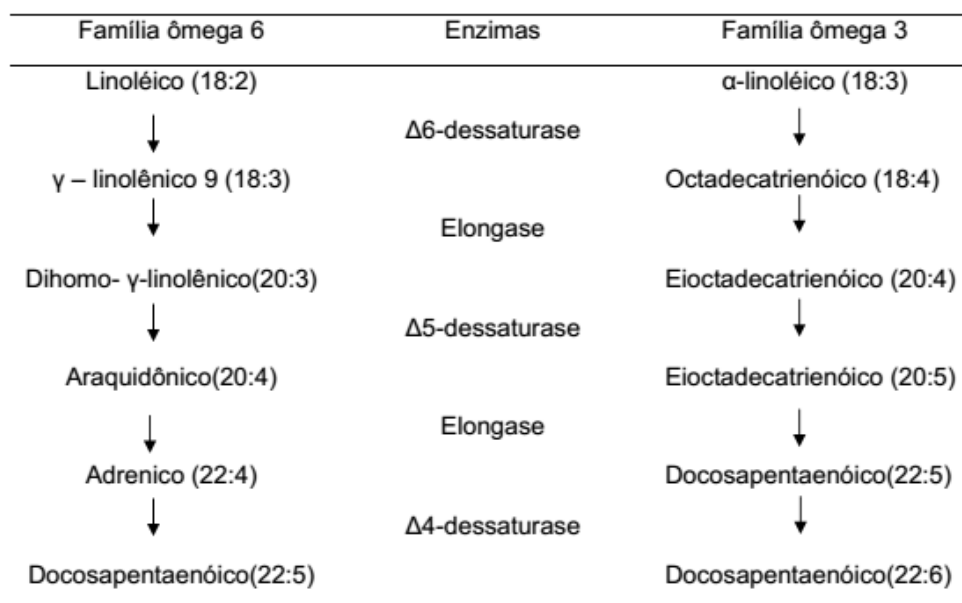
Figura 1 - Estrutura química dos principais PUFA n-3 e n-6



O precursor dos AG n-6 é o ácido linoléico (C18:2n-6, LA) e o precursor dos AG n-3 é o ácido  $\alpha$ -linolênico (C18:3n-3, ALA). Através de uma série de reações (alongamentos e dessaturações) pelo sistema enzimático humano os demais AG n-6 como o ácido araquidônico (C20:4n-6; AA) e o ácido  $\gamma$ -linolênico (18:3n-6; GLA) podem ser sintetizados a partir do LA, e os AG da série n-3 como o ácido eicosapentaenóico (C20:5n-3; EPA), o ácido docosapentaenóico (C22:5n-3, DPA) e o ácido docosahexaenóico (C22:6n-3, DHA) podem ser sintetizados a partir do ALA (Figura 2). No entanto, a conversão de ALA em EPA, DPA e DHA é baixa e assim todos esses AG da série n-3 também são considerados essenciais e devem ser supridos pela dieta (RUBIO-RODRÍGUEZ et al., 2010).



Figura 2 - Metabolismo dos ácidos graxos essenciais



### 3.1.1 Importância dos AG para a saúde humana

A importância dos AG para a saúde humana começou a ganhar destaque na década de 80 quando vários estudos epidemiológicos mostraram a relação entre uma dieta enriquecida com PUFAs da série n-3 e a prevenção de algumas doenças, com destaque para as DCV, e com impacto positivo também sobre o diabetes, a esclerose múltipla e asma brônquica (KROMANN; GREEN, 1980; DYERBERG, 1986). Nos seres humanos, o LA e o ALA são necessários para manter em condições normais as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Esses AG também participam da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, da síntese da hemoglobina e da divisão celular. Os AG n-3, principalmente o EPA e DHA, não são apenas essenciais para o crescimento normal e desenvolvimento do organismo, mas também por seus efeitos positivos sobre o coração, o cérebro, os olhos, as articulações, a pele, o humor e o comportamento (PELLICCIA et al., 2013). Estão envolvidos na prevenção da doença arterial coronariana, hipertensão, diabetes, artrite, outras desordens inflamatórias e autoimunes e câncer (TUR et al., 2012). Muitos estudos incentivam a ingestão adequada de EPA e DHA, por mulheres grávidas e lactantes por melhorar a saúde geral fetal e o desenvolvimento do cérebro e da

retina no feto (CONNOR, 2000). Os PUFAS da série n-6, principalmente o ácido araquidônico, estão fortemente relacionados com o desenvolvimento do cérebro e da retina durante o período gestacional e os primeiros anos de vida (SCHUCHARDT; HAHN, 2011).

Além do incentivo ao consumo de AG n-3, deve ser destacado a importância da relação n-6/n-3 na dieta. Com a revolução agrícola, houve um aumento do consumo de cereais, óleos e grãos ricos em AG n-6 e uma diminuição paralela da ingestão de AG n-3 e assim a razão n-6/n-3 apresenta grande variação na dieta das populações mundiais. A maior parte dos estudos conclui que, para a promoção da saúde geral, a relação n-6/n-3 deveria ser mais baixa do que a atualmente encontrada na população ocidental (GÓMEZ et al., 2011). Essa relação originalmente era em torno de 1:1 a 2:1 e hoje está numa faixa de 15:1 a 40:1 na dieta ocidental (SIMOPOULOS, 2006, 2008). Na Índia a relação da ingestão n-6/n-3 é de até 50:1 e no Japão é de 12:1 (SIMOPOULOS, 2008). A mortalidade por eventos cardiovasculares é cinco vezes maior entre os indianos (WHO, 2014), o que demonstra que uma dieta com menor razão n-6/n-3 favorece a diminuição da mortalidade por DCV. Alguns especialistas defendem diminuir essa relação por meio tanto do aumento do consumo de n-3 como também pela redução de n-6. De forma condizente, em um estudo clínico prospectivo de prevenção secundária em indivíduos pós-infarto do miocárdio com uma dieta experimental mediterrânea caracterizada, entre outros fatores, por ser mais rica em ALA e mais pobre em LA, associou-se a uma redução de até 70% na mortalidade total. Tal dieta incluía substituição de óleo de milho por azeite de oliva e diminuiu a relação n-6/n-3 até 4:1 (LORGERIL et al., 1994). Assim, a razão n-6/n-3 em torno de 5:1 ou menos é recomendada por vários órgãos de promoção da saúde (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2013) e alimentos que possuem naturalmente esta relação menor do que 4, como os óleos de peixes, de linhaça e de canola (Tabela 1) tiveram seu consumo incentivado nas últimas décadas.

Tabela 1 - Composição de PUFAS (g/100g de óleo) em diferentes tipos de óleos vegetais e animais.

| Óleo                      | n-3  | n-6  | n-6/n-3 |
|---------------------------|------|------|---------|
| <b>Girrasol</b>           | 0,10 | 63,2 | 632     |
| <b>Milho</b>              | 0,90 | 50,4 | 56      |
| <b>Soja</b>               | 7,30 | 51,5 | 7,05    |
| <b>Linhaça</b>            | 12,7 | 53,3 | 0,2     |
| <b>Palma</b>              | 0,30 | 10,1 | 33,66   |
| <b>Canola</b>             | 11   | 28   | 2,54    |
| <b>Oliva</b>              | 0,70 | 7,8  | 11,14   |
| <b>Fígado de bacalhau</b> | 19,8 | 0,9  | 0,04    |
| <b>Arrenque</b>           | 11,9 | 12   | 1,01    |
| <b>Salmão</b>             | 35,3 | 1,06 | 0,03    |
| <b>Sardinha</b>           | 28,1 | 2,2  | 0,07    |

Fonte: Adaptado de Rubio-Rodriguez et al., 2010.

Os MUFAs também apresentam um efeito benéfico juntamente com os PUFAS na redução do risco de doenças cardiovasculares. Uma dieta rica em MUFAs, como o ácido oléico (n-9), reduz a glicose e a pressão arterial, além de aumentar os níveis do colesterol HDL (FORNAZZARI et al., 2007).

### 3.1.2 Fontes de ácidos graxos essenciais

Os lipídeos da dieta são importantes fontes de energia e precursores de numerosos compostos biologicamente ativos. As plantas e alguns micro-organismos marinhos, podem sintetizar os PUFAS precursores da série n-3 e n-6, ao contrario dos mamíferos, pois não conseguem produzir as duplas ligações situadas no terceiro e sexto átomos de carbono. Assim, de forma direta ou indireta os AG essenciais estão presentes tanto em espécies vegetais como animais empregados na alimentação humana (Tabela 2). O óleo de canola e de linhaça são opções de fonte dietética de AG da família n-3, principalmente para os vegetarianos e indivíduos que não consomem peixe (VIANNI; BRAZ-FILHO, 1996).

Tabela 2 - Ácidos graxos da família n-3 e n-6 e suas fontes naturais

|                        |            |  |
|------------------------|------------|--|
| Ácido graxo<br>ômega-3 | ALA        | Vegetais folhosos verde escuro, nozes, linhaça, cânhamo, canola, soja, mostarda, chia, amendoim  |
|                        | EPA<br>DHA | Peixes gordos de água fria (salmão, cavala e arenque), fígado de bacalhau e linguado, gordura de mamíferos marinhos (baleias e focas) e algumas espécies de algas marinhas |
| Ácido graxo<br>ômega 6 | LA         | Sementes oleaginosas (nozes, pistaches, amendoins, sementes de abóbora) e óleos vegetais (algodão, milho, girassol, soja, canola).   |
|                        | AA         | Gema do ovo, vísceras, carne de animais terrestres e carne de peixes tropicais   |

ALA – ácido alfa-linolênico; EPA - ácido eicosapentaenóico; DHA – ácido docosahexaenóico; LA - ácido linoléico; AA - ácido araquidônico.

FONTE: VIANNI; BRAZ-FILHO, 1996.

A principal fonte comercial de PUFAs contendo os metabólitos poli-insaturados da família n-3, especialmente EPA e DHA é o óleo proveniente de peixes marinhos de águas frias, que geralmente habitam ambientes de águas profundas tal como salmão, cavala e arenque. No entanto, os peixes não produzem PUFAs de uma maneira natural. O acúmulo nos peixes marinhos é, na verdade, devido à ingestão de muitas plantas marinhas especialmente algas unicelulares de fitoplancton, que já contém os PUFAs sintetizados (Cao et al., 2012).

Além disso, o óleo de peixe apresenta alguns inconvenientes e variações em sua composição de AG, devido a vários fatores como a disponibilidade de alimentos, idade, sexo, temperatura da água, localização geográfica, estação do ano e elevado custo de purificação. Um fato importante é a baixa aceitabilidade do óleo de peixe pelos pacientes, devido à inconveniência peculiar do odor e paladar e pela necessidade de ingerir altas doses por longos períodos de tempo (WEN E CHEN, 2001; MARTINS et al., 2008)

### 3.2 MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE LIPÍDEOS

Muitos autores têm estudado a síntese de lipídeos por via microbiana. Grande parte deles voltados para a possibilidade de obter alternativas para a carência de alimentos e outra, para a produção de energia (BEOPOULOS et al., 2009). Muitos micro-organismos, como microalgas, fungos e bactérias, têm

a capacidade de acumular lipídeos que são sintetizados durante o processo de crescimento como parte de seu processo metabólico e como reserva de carbono. A composição dos lipídeos, quantidade e qualidade são variáveis, e dependem da espécie do micro-organismo, da fase de crescimento, das condições ambientais e dos substratos do meio de cultivo (SILVA, 2011).

A produção industrial a partir de micro-organismo tem vantagem sobre outras fontes de óleos, pois não necessita de grandes extensões de terra agriculturável e de enormes quantidades de água. Além disso, o óleo microbiano apresenta elevada percentagem de PUFAs o que confere melhor valor de mercado quando comparado a outros óleos de menor qualidade. A produção do óleo microbiano pode ser feita durante todo do ano, pois não há dependência sazonal ou climática. Os PUFAs produzidos são de alto grau de pureza e com qualidade controlada (WELLBAUM, 2006; JINGYANG et al., 2012).

O estudo de diferentes micro-organismos para a produção de lipídeos é uma alternativa para a substituição de fontes convencionais de óleos e gorduras. Estes lipídeos apresentam composição semelhante aos óleos vegetais, podendo ser empregados para fins alimentares, combustíveis alternativos, bem como na produção de compostos específicos de uso limitado, como produtos farmacêuticos (JINGYANG et al., 2012).

Segundo Ratledge (1996), as principais classes de micro-organismos utilizados para a produção de lipídeos, são as leveduras e os fungos filamentosos. Os fungos podem produzir até 40% de sua biomassa em lipídeos e algumas espécies de levedura são capazes de produzir entre 30% e 70% de lipídeos, como por exemplo, a *Lipomyces* (CARVALHO, 1994). Considera-se que os micro-organismos podem acumular mais de 20% de lipídeos em sua biomassa como espécies oleaginosas (MENG et al., 2009).

Os lipídeos podem ser acumulados através de duas maneiras: uma é por meio da síntese de lipídeos “*de novo*”, que é a via metabólica que envolve a produção de AG precursores, como o acetil-CoA e o malonil-CoA, e sua posterior integração na via biossintética de armazenamentos de lipídeos na forma de triacilgliceróis e glicerídeos que serão armazenados dentro dos corpos lipídicos. A outra maneira a qual os lipídeos intracelulares podem ser acumulados é por meio da síntese de lipídeos “*ex novo*”, que envolve a quebra

de AG, óleos e triglicerídeos a partir de meio de cultura e seu acúmulo em uma forma não alterada ou modificada dentro da célula. Esta via requer a hidrólise de substrato hidrofóbico e posterior incorporação/transporte de AG na forma de tioésteres-CoA dentro da célula, os quais levam ao acúmulo de lipídeos dentro dos corpos lipídicos (BEOPOULOS et al., 2009, 2011).

### 3.2.1 Fungos produtores de lipídeos

Os fungos são organismos que formam filamentos ou hifas, sua classificação atual inclui organismos eucarióticos, uni ou pluricelulares, heterótrofos e que podem se reproduzir de forma sexuada ou assexuada (MALAJOVICH, 2012). São predominantemente aeróbios, com temperatura ótima de crescimento entre 25°C e 30°C e pH entre 4 e 7. Os fungos filamentosos, devido à capacidade de crescer em substratos simples e de baixo custo, e por apresentarem uma grande capacidade de produzir diversos metabólitos (vitaminas, polissacarídeos, pigmentos, lipídeos e glicolipídeos), vêm despertando um grande interesse para o uso biotecnológico (MEYER, 2008).

Os lipídeos ocorrem nos fungos como constituintes da parede celular, material de reserva e em alguns casos como compostos extracelulares. A proporção de lipídeos que pode ser armazenado pelo fungo irá depender da sua fisiologia, das condições ambientais e da quantidade de nutrientes (carbono e nitrogênio), além da temperatura e do pH (BEOPOULOS et al., 2009). Estes fatores quando controlados podem acarretar maior acréscimo de lipídeos na biomassa fúngica.

Alguns trabalhos relatam a produção de PUFA's utilizando fungos, como *Pythium ultimum*, *Rhizopus arrhizus*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Botrytis cinerea* e *Mortierella alpina*, utilizando processos em sistema líquido onde estes micro-organismos foram cultivados sob diferentes condições de estresse, nutrientes, pH, relação carbono/nitrogênio (C/N), adição de íons de cobre, zinco e ferro e processos envolvendo produção de enzimas desaturases e sua caracterização (HERBERT; KEITH, 1989; BIJL et al., 2001; URSIN, et al., 2006).

Nos micro-organismos, os lipídeos são sintetizados durante a fase de crescimento como parte de seu processo metabólico e como reserva de carbono. O acúmulo de lipídeos inicia sob condições limitantes de nitrogênio e na presença de uma fonte de carbono em excesso, assim uma alta razão de C/N, próxima de 100, é um requisito básico para o acúmulo de lipídeos (MULDER et al., 1962). A condição de operação em termos de temperatura e agitação também pode contribuir para determinar a quantidade e o perfil de PUFA's que será produzido (GAO et al, 2013).

O elevado custo para a produção do óleo microbiano está associado, principalmente, ao tipo da fonte de carbono utilizada. Cerca de 80% do custo total do meio provem do alto preço da glicose (TSIGIE et al., 2011). Uma considerável variedade de fontes de carbono, além da glicose, como a frutose, xilose, sacarose e amido têm sido investigados como substratos alternativos no cultivo de micro-organismos oleaginosos para o acúmulo de lipídeos. Exemplos relatados recentemente na literatura encontram-se resumidos na Tabela 3.

Na Tabela 3 é possível observar que os micro-organismos que apresentaram maiores rendimentos na produção de lipídeos foram as espécies *Cryptococcus curvatus* e *Epicoccum purpurascens*. Essas espécies quando cultivadas utilizando, respectivamente, glicose e sacarose como fonte de carbono apresentaram um rendimento lipídico de 82,7% e 80%, respectivamente. No trabalho realizado por Papanikolaou et al. (2010), a espécie *Thamnidium elegans* quando cultivada utilizando, glicose, frutose e sacarose, mostrou que independentemente da fonte de carbono utilizada, quantidades elevadas de lipídeos podem ser acumulados no micro-organismo, que nesse caso variou de 64,1-65,9%.

Tabela 3 - Quantidade de lipídeos acumulados por diferentes espécies de micro-organismos.

| <b>Espécies</b>                                   | <b>Fonte de carbono</b>                      | <b>Lipídio<br/>(% biomassa seca)</b> | <b>Fonte</b>                 |
|---|--|--------------------------------------|------------------------------|
| <i>Aspergillus terreus</i>                        | Bagaço de cana-de-açúcar                     | 19,0                                 | Kamat et al. (2013)          |
| <i>Aspergillus terreus</i> IBB M1                 | Glicose                                      | 54,0                                 | Khot et al. (2012)           |
| <i>Candida curvata</i>                            | Xilose                                       | 48,6                                 | Evans e Ratledge (1983)      |
| <i>Chlorella protothecoides</i>                   | Amido de mandioca                            | 26,5                                 | Wei (2009)                   |
| <i>Colletotrichum</i> sp. e <i>Alternaria</i> sp. | Glicose, sacarose, frutose, lactose e xilose | 50,0                                 | Dey et al. (2011)            |
| <i>Cryptococcus curvatus</i>                      | Glicose                                      | 82,7                                 | Zhang et al. (2011)          |
| <i>Cryptococcus curvatus</i>                      | Glicerina                                    | 52,0                                 | Liang et al. (2010)          |
| <i>Epicoccum eurpurascens</i>                     | Sacarose                                     | 80,0                                 | Koutb e Morsy (2011)         |
| <i>Lipomyces starkeyi</i>                         | Fécula de batata                             | 40,0                                 | Wild (2010)                  |
| <i>Metschnikowia pulcherrima</i>                  | lignocelulose                                | 40,0                                 | Santamauro et al. (2014)     |
| <i>Mortierella isabellina</i>                     | Casca de arroz hidrolisado                   | 64,3                                 | Economou et al. (2011)       |
| <i>Mortierella isabellina</i>                     | Farelo de trigo                              | 53,0                                 | Zeng et al. (2013)           |
| <i>Mortierella isabellina</i>                     | Soro de leite coalhado                       | 21,3                                 | Demir et al. (2013)          |
| <i>Rhodospiridium toruloides</i>                  | Resíduos da produção de biodiesel (glicerol) | 41,0                                 | Kiran et al. (2013)          |
| <i>Rhodotorula Glacialis</i> DBVPG 4785           | Glicose                                      | 68,0                                 | Amaretti et al. (2010)       |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>                   | Amido de mandioca                            | 47,9                                 | Zhao et al. (2010)           |
| <i>T. spathulata</i> e <i>K. ohmeri</i>           | Glicerol bruto                               | 53,3                                 | Kitcha e Cheirsilp (2011)    |
| <i>Thamnidium elegans</i>                         | Glicose                                      | 64,1                                 | Papanikolaou et al. (2010)   |
| <i>Thamnidium elegans</i>                         | Frutose                                      | 65,9                                 | Papanikolaou et al. (2010)   |
| <i>Thamnidium elegans</i>                         | Sacarose                                     | 64,6                                 | Papanikolaou et al. (2010)   |
| <i>Torulaspota globosa</i> YU5 / 2                | Glicose                                      | 45,7                                 | Leesing e Baojungharn (2011) |

Fonte: TONATO, 2015.

O óleo produzido por fungos oleaginosos tem maior número de insaturações quando comparado ao óleo produzido pelas leveduras, e por essa razão os fungos oleaginosos são os mais utilizados para produzir óleos com elevada concentração de PUFAS de interesse médico e dietético



(PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011). A Tabela 4 apresenta a composição dos AG de óleo microbiano obtido a partir de vários MO oleaginosos, utilizando diferentes fontes de carbono. Os AG encontrados em maior quantidade são o palmítico (C16: 0), esteárico (C18: 0), oléico (C18:1n9), linoléico (C18:2n6) e linolênico (C18:3n3). O perfil de AG depende de cada espécie, a *Chlorella protothecoides* apresenta um maior teor de ácido linoléico em comparação com leveduras e fungos oleaginosos, *Elegans thamnidium* contém um alto teor de ácido oléico, enquanto a *Rhodotorula glutinis* é relativamente rica em ácido esteárico.

Tabela 4 - Composição dos ácidos graxos de óleo microbiano.

| Espécies                        | Fonte de carbono                    | C12-C14 | C16  | C18: 0 | C18: 1 | C18: 2 | C18: 3 | C20-C22 |
|---------------------------------|-------------------------------------|---------|------|--------|--------|--------|--------|---------|
| <i>Scenedesmus obliquus</i>     | CO <sub>2</sub>                     | 0,2     | 25,1 | 2,3    | 0,9    | 19,0   | 41,5   | 0,8     |
| <i>Chlorella vulgaris</i>       | CO <sub>2</sub>                     | N/D     | 26,1 | 1,3    | 24,8   | 47,8   | N/D    | N/D     |
| <i>Chlorella zofingiensis</i>   | CO <sub>2</sub>                     | N/D     | 28,8 | 3,7    | 17,9   | 20,8   | 12,2   | N/D     |
| <i>Chlorella protothecoides</i> | Glicose                             | N/D     | 23,9 | 1,2    | 35,2   | 20,2   | 8,3    | N/D     |
|                                 | Glicose                             | N/D     | 23,6 | 3,9    | 27,1   | 30,2   | 6,0    | N/D     |
|                                 | Amido de mandioca                   | N/D     | 24,9 | 0,7    | 24,6   | 31,4   | 6,0    | N/D     |
| <i>Rhodotorula glutinis</i>     | Glicose                             | N/D     | 24,9 | 32,2   | 24,8   | 0,3    | 0,4    | N/D     |
|                                 | Xilose                              | N/D     | 38,2 | 28,0   | 7,4    | 5,0    | N/D    | N/D     |
|                                 | Glicerina                           | N/D     | 16,0 | 21,9   | 18,0   | 15,9   | 1,8    | N/D     |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | Tubérculo de alcachofa de Jerusalém | 1,4     | 23,6 | 9,1    | 54,7   | 11,3   | N/D    | N/D     |
| <i>Yarrowia lipolytica</i>      | Palha de trigo                      | N/D     | 5,7  | 0,8    | 55,3   | 20,9   | N/D    | N/D     |
| <i>Lipomyces starkeyi</i>       | Palha de trigo                      | N/D     | 37,1 | 5,5    | 45,1   | 4,9    | N/D    | N/D     |
| <i>Cryptococcus curvatus</i>    | Glicerol bruto                      | N/D     | 23,0 | 16,7   | 39,6   | 15,2   | N/D    | N/D     |
| <i>Candida curvata</i>          | Glicose                             | N/D     | 33,0 | 12,0   | 42,9   | 7,3    | N/D    | N/D     |
|                                 | Sacarose                            | N/D     | 32,4 | 11,3   | 42,0   | 6,7    | N/D    | N/D     |
|                                 | Xilose                              | N/D     | 41,2 | 14,0   | 43,0   | 3,5    | N/D    | N/D     |
|                                 | Etanol                              | N/D     | 26,5 | 12,5   | 49,0   | 8,9    | N/D    | N/D     |
| <i>Elegans Thamnidium</i>       | Glicose                             | N/D     | 21,8 | 6,0    | 55,9   | 10,5   | 5,0    | N/D     |
|                                 | Frutose                             | N/D     | 26,1 | 8,4    | 56,0   | 6,8    | 1,8    | N/D     |
|                                 | Sacarose                            | N/D     | 28,6 | 5,3    | 52,8   | 7,4    | 5,5    | N/D     |

Nota: N/D = Não disponível. Números de 0 a 3 indica o grau de insaturação para C18.  
Fonte: JINGYANG et al. (2012).

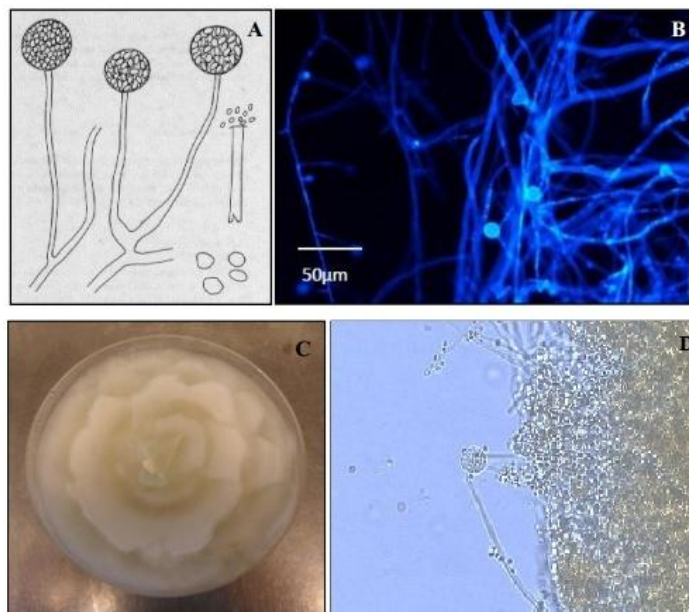
As espécies de fungos, como *Cryptococcus curvatus*, *Aspergillus terreus*, *Claviceps purpurea*, *Tolyposporium*, *Mortierella alpina* e *Mortierella isabelina* apresentam a característica de acumular lipídeos e a maioria desses fungos produz AG da família n-3 como o DHA, EPA e da família n-6 como o AA (LI, Q. et al., 2008).

Um *screening* da produção de AG em 31 espécies de fungos pertencentes às classes *Oomycetes*, *Zigomycetes*, *Ascomycetos* e *Basidiomicetos* detectou maior percentagem de PUFAs n-6 nos representantes da ordem *Mucorales* (SHAW, 1965) e por esta razão os fungos filamentosos dessa ordem são os mais intensamente estudados para a produção de PUFAs, com destaque para as espécies *Mortierella alpina*, *M. elongata*, *M. isabelina* (CHAUDHURI et al., 1998; XIAN et al., 2003; ZHU et al., 2006), *Cunninghamella echinulata* (GEMA et al., 2002; FAKAS et al., 2006), *Mucor rouxii*, *M. circinelloides*, *M. hiemalis* (WYNN et al., 2001; SILVA et al., 2003; AHMED et al., 2006; JEENNOR et al., 2006; CERTIK et al., 2006).

### 3.2.1.1 *Mortierella isabelina*

Os fungos pertencentes ao gênero *Mortierella* (família *Mortierellaceae*, ordem *Mucorales*, classe *Zigomicetos*) são cosmopolitas, sapróbios e alguns poucos são parasitas de animais e plantas (DOMSCH et al., 1980; NAGY et al., 2011). Morfologicamente, o gênero *Mortierella* produz colônias brancas em placas de ágar (Fig. 3C) ou bolinhas brancas ou amarelo claro, semelhantes ao algodão, em meios líquidos. O crescimento do micélio é relativamente rápido e consiste de hifas finas e ramificadas onde há formação de esporângios com esporos (GUERRERO; SILVEIRA, 1996), que podem ser visualizados microscopicamente (Fig 3) .

Figura 3 – *Mortierella sp* e *Mortierella isabelina*



(A) ilustração de uma hifa de *Mortierella sp.* com esporângio; (B) imagem microscópica de uma hifa de *Mortierella sp.* corada com DAPI e visualizada na luz UV; (C) *Mortierella sp.* em meio BDA (batata, dextrose, ágar) e (D) imagem microscópica (40x) de hifas de *Mortierella isabelina* com esporângio.

Algumas cepas de *Mortierella* são capazes de degradar xenobióticos, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (SALICIS et al., 1999) e pesticidas (BADAWI et al., 2009; KATAOKA et al., 2011). Com relação à produção de lipídeos, as cepas *Mortierella alpina*, *Mortierella elongata* e *Mortierella isabelina* são as mais estudadas para a produção de óleo microbiano rico em PUFAs, (CHAUDHURI et al., 1998; XIAN et al., 2003; ZHU et al., 2006). Segundo Serrano et al. (2001) o aumento da produção de PUFAS, principalmente o AG n-6 GLA, em fungos da ordem dos *Mucorales* está relacionado com a fase de crescimento dos fungos e a fonte de carbono.

O fungo filamentoso *Mortierella isabellina* é capaz de acumular até 80% da sua biomassa celular em lipídeos (CHATZIFRAGKOU et al., 2010) e seu cultivo por fermentações pode utilizar vários tipos de substratos, incluindo açúcares monoméricos, glicerol, bem como biomassa lignocelulósica como casca de arroz e caule de milho hidrolisado (DEMIR et al., 2013). Papanikolaou et al. (2008) utilizaram glicerina ( $100\text{g.L}^{-1}$ ), co-produto do biodiesel, como fonte de carbono para a produção de lipídeos, resultando em um acúmulo de aproximadamente 51% do peso seco em lipídeos. Já Papanikolaou et al.

(2004) estudaram a produção de GLA utilizando altas concentrações de açúcar e controlando a relação C/N no meio, obtendo 35,9 g de biomassa/L com um acúmulo de 0,2 g de lipídeos/g de glicose e produção de 801,0 mg de GLA/L e 19 mg de GLA/g de biomassa.

### **3.2.2 Metodologia para extração de lipídeos e identificação de AG**

A extração de lipídeos é uma determinação de grande importância em análises bioquímica, fisiológica e nutricional dos mais variados tipos de amostras. Portanto, deve ser realizada com exatidão e precisão. Algumas dessas amostras necessitam de uma atenção especial para a obtenção da fração lipídica, pois alguns fatores como coextração dos componentes não lipídicos e a oxidação indesejada podem intervir no resultado final da fração lipídica (BRUM et al., 2009).

O processo de extração de lipídeos a partir de micro-organismos exige o rompimento celular que pode ser realizado utilizando processos químicos, físicos ou bioquímicos. A definição dos solventes a serem utilizados no processo, é um fator de extrema importância que deve ser levado em consideração. Na grande maioria dos processos é utilizada uma mistura de solventes objetivando uma maior eficiência da extração (SILVA, 2011).

A escolha de solventes para a extração de lipídeos deve ser realizada baseando-se em vários fatores adicionais como volatilidade, capacidade para formar um sistema de duas fases com água (para remover não-lipídeos), custo, toxicidade, poder de extração para as diferentes classes de lipídeos, entre outros (HARA; RADIN, 1978).

Um método clássico de extração de lipídeos totais é o método de Soxhlet (1879) que utiliza hexano como solvente. Este método envolve o uso de um extrator e tem como desvantagem o prolongado tempo de exposição ao solvente quente (próximo da sua temperatura de ebulição) que passa pelo interior da amostra durante um tempo prolongado, em geral entre 5 a 8 horas, podendo conduzir à degradação de compostos termossensíveis, devido ao seu longo período de exposição ao calor. Outros métodos de extração conhecidos, como métodos de extração a frio quando comparados ao método de Soxhlet

(1879), envolvem a utilização de ao menos dois tipos de solventes (FOLCH et al., 1957; BLIGH; DYER, 1959; HARA; RADIN, 1978).

O método descrito por Hara e Radin (1978), utilizando n-hexano – isopropanol – água, foi analisado para a extração de lipídeos de amostras de vegetal e animal, sendo que otimizações do mesmo podem torná-lo aplicável para a extração de lipídeos, substituindo os solventes altamente tóxicos. O método de Folch et al. (1957) e o de Bligh e Dyer (1959) utilizam clorofórmio e metanol para a extração de lipídeos em amostras vegetal e animal, porém em proporções diferentes. Apesar da toxidez destes solventes, tais métodos têm sido os mais utilizados em trabalhos envolvendo extração da fração lipídica de micro-organismos. Isso devido ao alto teor de lipídeos extraído da biomassa e pela capacidade que os sistemas testados apresentaram em extrair eficientemente os lipídeos polares de membranas celulares (SOMASHEKAR et al., 2002; JANG et al., 2005; DIAS et al., 2013).

Alguns métodos alternativos de extração de lipídeos vêm sendo desenvolvidos, os quais são baseados em misturas que contém alcano-álcool-água, tais como: hexano-isopropanol-água. Essas misturas têm sido propostas como um sistema de solventes menos tóxicos, de menor custo e menor extração de substâncias não lipídicas quando comparadas com a mistura de clorofórmio-metanol-água (TANAMATI et al., 2010). Outros métodos alternativos com base na redução de volume de solvente foram propostos como, a extração em fase sólida, extração com fluido supercrítico e extração assistida por micro-ondas. Apesar desses métodos apresentarem vantagens em questões ambientais e de segurança laboratorial, eles são menos usuais para extração de lipídeos, pois os equipamentos e materiais requeridos no processo são de alto custo (DIAS et al., 2013).

Uma extração efetiva dos lipídeos da biomassa é realizada com células fisiologicamente ativas, pois células cultivadas há muitos dias ou que estejam na fase estacionária de crescimento podem se degenerar, pois neste estado pode ocorrer autólise parcial de lipídeos e de outros constituintes celulares. Quando proteínas ou carboidratos são utilizados ou degradados o conteúdo lipídico celular aumenta. Pela mesma razão, as células para análise não devem esperar muito tempo após serem separadas. Poucas horas na temperatura ambiente podem provocar mudanças na composição dos lipídeos das células,

como também, amostras deixadas sob refrigeração por doze horas podem apresentar mudanças significativas na composição celular (CHRISTIE, 1982).

### 3.3 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Os metabólitos secundários, como os lipídeos, podem ser obtidos por processo fermentativo (SANCHEZ; DEMAIN, 2012), na qual a fermentação submersa é a mais utilizada atualmente pela facilidade operacional, economia, espaço reduzido e por possibilitar o controle sobre as condições dos meios de cultivo (MACHADO, 2002). Os processos submersos são aqueles em que o micro-organismo, ou mesmo outras células, desenvolvem-se em meio de cultura com excesso de água sob agitação. A fermentação submersa é o processo mais utilizado na produção comercial/escala industrial de bioprodutos (GIBBS et al., 2000), pois apresenta o maior número de pesquisas e instrumentações para o controle do processo, tornando-a mais acessível que a fermentação semi-sólida (FUGLSANG, 2002). Dentre as vantagens da fermentação submersa estão a facilidade de controlar os parâmetros físico-químicos, como controle de temperatura devido ao alto teor de água, a melhor absorção de nutrientes e recuperação de metabólitos e ainda redução da possibilidade de degradação do produto (CASTRO, 2010).

Os processos de fermentação submersa com fungos variam o tempo de fermentação de 5 a 12 dias, com uma temperatura em torno de 24-35 °C e agitação de 50-150 rpm. A agitação para os fungos deve ser mais branda em comparação com células de bactérias, uma vez que altas taxas de agitação aumentam as tensões de cisalhamento no biorreator prejudicando o crescimento do micélio e, assim, reduzindo a biomassa fúngica (KLAIC, 2014). O cultivo submerso de fungos é considerado um processo multicomponente onde o crescimento celular e a formação de produtos são influenciados pelos parâmetros operacionais que envolvem a fermentação, como: composição do meio de cultura, temperatura, pH do meio, forças de cisalhamento, reologia e morfologia do fungo, natureza e concentração do substrato celulósico, disponibilidade de nutrientes, presença de indutores e, outros parâmetros como agitação do meio reacional, configuração dos impelidores, quantidade de oxigênio dissolvido, etc. Todos esses parâmetros podem variar durante o

processo fermentativo e a relação desses parâmetros com o complexo formado deve ser analisado durante a fermentação (SINGHANIA et al., 2010).

Normalmente o desenvolvimento de uma fermentação microbiana começa com sua otimização (temperatura, pH, pressão, agitação, concentrações de biomassa e nutrientes) em bancada, a partir da agitação da cultura em frascos, para depois a utilização de fermentadores de bancada, e posteriormente, com as variáveis bem estudadas a ampliação para a escala industrial (HOSOBUCH; YOSHIKAWA, 1999).

Os biorreatores mais utilizados são os agitados mecanicamente (STR – *Stirred Tank Reactor*), também conhecidos como reatores de mistura ou tanque agitado, e devido a sua versatilidade, são considerados um modelo de referência para a indústria de processos, constituindo cerca de 90% do total dos reatores utilizados industrialmente (OJEDA, 2009). Sua forma de construção é de um tanque cilíndrico, normalmente equipado com chicanas ou aletas, dispositivo que impede a livre circulação do fluido e evita a formação de movimentos espirais ao redor do centro do tanque durante a agitação do líquido (SHMIDELL e FACCIOTTI, 2001). As vantagens do biorreator do tipo STR estão relacionadas ao fato de que a agitação mecânica favorece a homogeneização, suspensão de sólidos, dispersão gás-líquido, aeração e a transferência de calor e massa (ONKEN ET AL., 1983).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MICRO-ORGANISMO

A cepa *Mortierella isabellina* foi adquirida da Fundação André Tosello - Coleção de Culturas Tropical (Campinas-SP) e foi mantida por repiques mensais a 4°C em placas de petri estéreis contendo meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA).

### 4.2 FERMENTAÇÃO EM AGITADOR ORBITAL

O crescimento do fungo foi realizado em placas de Petri estéreis contendo o meio de cultura BDA por 120 horas de incubação a 28°C. A multiplicação celular foi efetuada através da raspagem do micélio de uma placa de Petri, o qual foi inoculado em frascos contendo 20 mL de meio BD (batata dextrose) e mantidos durante 48h a 28°C num agitador orbital a 120 rpm.

A fermentação foi efetuada em Erlenmeyers com 200 mL de meio de cultura e 10% de inóculo (v/v) em agitador orbital durante 120h. Para a avaliação do perfil de AG e produção de lipídeos foi delineado um planejamento experimental do tipo Plackett-Burman onde as variáveis estudadas foram: extrato de levedura (0-1,5 g.L<sup>-1</sup>), peptona (0-1,5 g.L<sup>-1</sup>), sacarose (50-190 g.L<sup>-1</sup>), temperatura (24-32 °C), agitação (100-200 rpm) e pH (5-7), com triplicata do ponto central (Tabela 5). A composição de nutrientes foi mantida fixa: 2,0 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,0 g.L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,0 g.L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.

Através da análise dos efeitos do planejamento Plackett Burman, novos ensaios foram realizados avaliando a influência do aumento da concentração de extrato de levedura (2,25 g.L<sup>-1</sup>, 3,00 g.L<sup>-1</sup> e 3,75 g.L<sup>-1</sup>) na fermentação.



### 4.3 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA BIOMASSA E ACÚMULO DE LIPÍDEOS

Na melhor condição de fermentação em frascos agitados foi realizada uma cinética de crescimento, avaliando o crescimento da biomassa e o teor de lipídeos totais ao longo das 120 h de fermentação em agitador orbital. As amostras foram coletadas a cada 24 h.

### 4.4 FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR STR

O crescimento do fungo foi realizado em placas de Petri contendo o meio BDA por 120h de incubação a 28°C. A multiplicação celular foi efetuada através da raspagem do micélio de uma placa de Petri, o qual foi inoculado em frascos contendo 250 mL de meio BD e mantidos durante 48h a 28°C num agitador rotativo a 120 rpm.

A partir da condição com maior acúmulo de PUFAs estudada no item 4.2 foi efetuada fermentações em biorreator STR de 5 L com 2,5 L de meio de cultura e 10 % de inóculo (v/v) durante 120h. O meio de cultura foi composto por: sacarose 50 g.L<sup>-1</sup>, peptona 1,5 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 3,75 g.L<sup>-1</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,0 g.L<sup>-1</sup>, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,0 g.L<sup>-1</sup>, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 1,0 g.L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 0,5 g.L<sup>-1</sup>. Os parâmetros temperatura (24°C) e pH (5,0) foram mantidos fixos. Um delineamento composto central 2<sup>2</sup> (DCC) foi descrito para avaliar o efeito das variáveis agitação (40-60 rpm) e aeração (1-3 vvm) no crescimento da biomassa fúngica, produção de lipídeos e no perfil dos AG.

### 4.5 SEPARAÇÃO DA BIOMASSA E EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS

A biomassa foi determinada através de centrifugação a 4000 rpm da massa de células durante 5 minutos, posteriormente as células foram lavadas com água destilada e secas em liofilizador durante 24h.

O teor de lipídeos foi determinado através da biomassa liofilizada de acordo com o método descrito por Bligh e Dyer (1959). Foi pesado cerca de 1 g

de amostra e adicionados 16 mL de metanol, 8 mL de clorofórmio e 6,4 mL de água destilada. A extração ocorreu através da agitação das amostras por 60 minutos a 250 rpm em mesa agitadora orbital. Após este período, foram adicionados 8 mL de clorofórmio e 8 mL de solução de sulfato de sódio 1,5% e novamente agitadas por 2 min. A fase orgânica contendo os lipídeos foi metade (5 mL) transferida para tubos de ensaio de 10 mL, onde foram secos com vácuo a 40 °C e 5 mL transferidos para béqueres, onde foram secos a 105 °C por 4 h. Após resfriamento em dessecador, o béquer é pesado e pela diferença de peso é calculado o percentual de lipídeos.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

A derivatização foi realizada segundo o método descrito por Hartman e Lago (1973). A fração lipídica nos tubos de ensaio (item 4.5) foi adicionada de 1 mL de solução metanólica de hidróxido de potássio (0,4 M) e mantida em banho-maria a 100 °C por 10 min. Após, os tubos foram resfriados e adicionados de 3 mL de solução metanólica de ácido sulfúrico (1 M) e novamente aquecidos a 100 °C por 10 min. Em seguida, os tubos foram resfriados e adicionados de 2 mL de hexano. Posteriormente, foi retirada a parte superior do tubo contendo os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) dissolvidos em hexano para análise cromatográfica.

O perfil dos AG foi analisado em cromatógrafo gasoso equipado com detector de ionização em chama (GC-FID) da marca Varian modelo Star3400CX (CA, USA) e amostrador automático Varian, modelo 4200 (CA, EUA). Os FAME foram separados em coluna capilar SP<sup>TM</sup>-2560 (SUPELCO, Bellefonte, EUA) (100 m x 0,25 mm x 0,20 µm). O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio à pressão constante de 25 psi. A identificação dos AG foi realizada pela comparação dos tempos de retenção dos analitos com os padrões autênticos, FAME Mix-37 (P/N 47885-U; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Os resultados foram expressos em percentual da área total dos cromatogramas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 FERMENTAÇÃO EM AGITADOR ORBITAL

Três diferentes componentes do meio de cultura (extrato de levedura, peptona e sacarose) e três parâmetros de fermentação (agitação, temperatura e pH) foram avaliados conforme o planejamento experimental Plackett-Burman. A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos para o teor de lipídeos, SFA, MUFAs e PUFAs.

O maior percentual produzido de PUFAs foi 22,32% (ensaio 2) na menor temperatura e maiores concentrações de extrato de levedura e peptona avaliadas. As maiores percentagens de PUFAs obtidas foram nas menores temperaturas (24°C), e nas maiores concentrações de nitrogênio (ensaios 1, 2 e 4). Já o menor acúmulo de PUFAs foi de 4,23% (ensaio 8), condição com ausência da fonte nitrogenada e temperatura mais elevada.

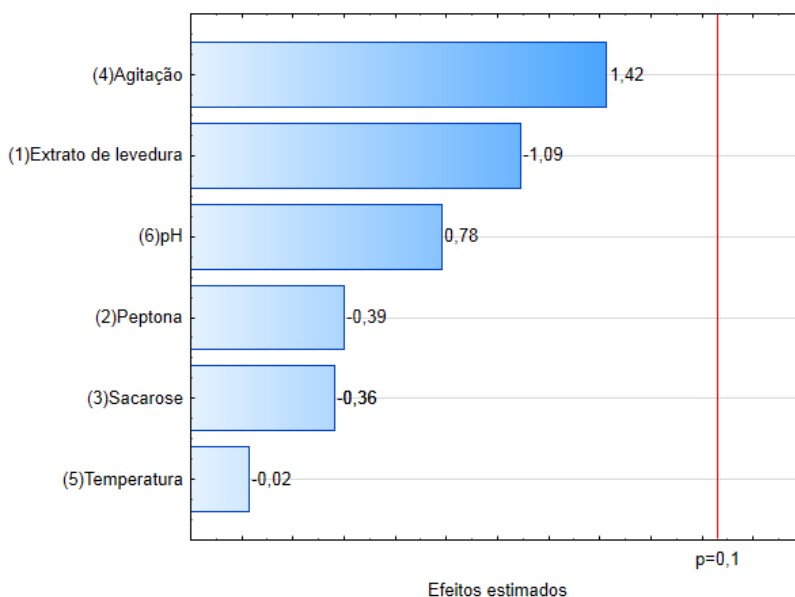
Tabela 5 - Matriz experimental do planejamento do tipo Plackett-Burman, variáveis codificadas e reais entre parênteses, acúmulo de lipídeos e perfil de AG produzidos após 120 h de fermentação.

| Ensaio   | Extrato de levedura (g.L <sup>-1</sup> ) | Peptona (g.L <sup>-1</sup> ) | Sacarose (g.L <sup>-1</sup> ) | Agitação (rpm)  | Temperatura (°C) | pH              | Teor de lipídios (%) | ΣSFA (%)     | ΣMUFA (%)    | ΣPUFA (%)    |
|----------|--|------------------------------|-------------------------------|-----------------|------------------|-----------------|----------------------|--------------|--------------|--------------|
| 1        | +1 (1,5)                                 | -1 (0)                       | +1 (190)                      | -1 (100)        | -1 (24)          | -1 (5,0)        | 7,68                 | 34,04        | 49,72        | 16,18        |
| <b>2</b> | <b>+1 (1,5)</b>                          | <b>+1 (1,5)</b>              | <b>-1 (50)</b>                | <b>+1 (200)</b> | <b>-1 (24)</b>   | <b>-1 (5,0)</b> | <b>4,32</b>          | <b>31,57</b> | <b>46,11</b> | <b>22,32</b> |
| 3        | -1 (0)                                   | +1 (1,5)                     | +1 (190)                      | -1 (100)        | +1 (32)          | -1 (5,0)        | 3,22                 | 33,73        | 52,64        | 13,72        |
| 4        | +1 (1,5)                                 | -1 (0)                       | +1 (190)                      | +1 (200)        | -1 (24)          | +1 (7,0)        | 4,12                 | 33,21        | 45,87        | 20,91        |
| 5        | +1 (1,5)                                 | +1 (1,5)                     | -1 (50)                       | +1 (200)        | +1 (32)          | -1 (5,0)        | 6,46                 | 37,66        | 49,11        | 13,21        |
| 6        | +1 (1,5)                                 | +1 (1,5)                     | +1 (190)                      | -1 (100)        | +1 (32)          | +1 (7,0)        | 3,72                 | 32,22        | 55,61        | 12,16        |
| 7        | -1 (0)                                   | +1 (1,5)                     | +1 (190)                      | +1 (200)        | -1 (24)          | +1 (7,0)        | 4,98                 | 41,3         | 53,62        | 4,5          |
| 8        | -1 (0)                                   | -1 (0)                       | +1 (190)                      | +1 (200)        | +1 (32)          | -1 (5,0)        | 12,77                | 43,11        | 52,71        | 4,23         |
| 9        | -1 (0)                                   | -1 (0)                       | -1 (50)                       | +1 (200)        | +1 (32)          | +1 (7,0)        | 9,92                 | 39,18        | 51,73        | 9,5          |
| 10       | +1 (1,5)                                 | -1 (0)                       | -1 (50)                       | -1 (100)        | +1 (32)          | +1 (7,0)        | 6,29                 | 35,28        | 52,19        | 12,43        |
| 11       | -1 (0)                                   | +1 (1,5)                     | -1 (50)                       | -1 (100)        | -1 (24)          | +1 (7,0)        | 4,17                 | 37,58        | 50,87        | 11,55        |
| 12       | -1 (0)                                   | -1 (0)                       | -1 (50)                       | -1 (100)        | -1 (24)          | -1 (5,0)        | 3,86                 | 31,18        | 52,88        | 15,98        |
| 13       | 0 (0,75)                                 | 0 (0,75)                     | 0 (120)                       | 0 (150)         | 0 (28)           | 0 (6,0)         | 8,96                 | 34,61        | 50,51        | 14,84        |
| 14       | 0 (0,75)                                 | 0 (0,75)                     | 0 (120)                       | 0 (150)         | 0 (28)           | 0 (6,0)         | 8,30                 | 34,43        | 50,94        | 14,62        |
| 15       | 0 (0,75)                                 | 0 (0,75)                     | 0 (120)                       | 0 (150)         | 0 (28)           | 0 (6,0)         | 8,23                 | 36,79        | 49,01        | 14,16        |

ΣSFA - (Somatória dos ácidos graxos saturados); ΣMUFA - (Somatória dos ácidos graxos monoinsaturados); ΣPUFA - (Somatória dos ácidos graxos poliinsaturados).

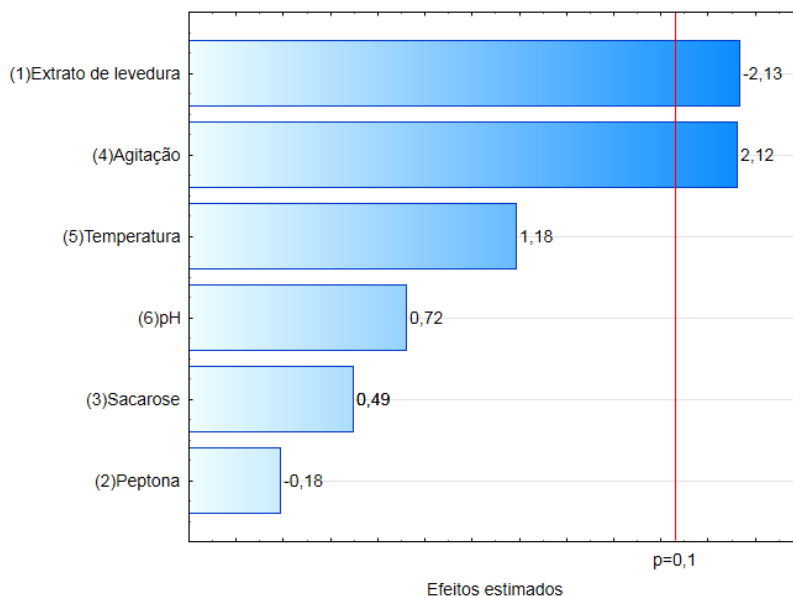
A Figura 4 apresenta os efeitos das variáveis independentes no teor de lipídeos total. A produção de lipídeos variou de 3,22% (ensaio 3) a 12,77% (ensaio 8) e nenhuma variável foi estatisticamente significativa ( $p < 0,1$ ).

Figura 4 - Gráfico de pareto demonstrando o efeito de cada variável sobre a produção de lipídeos após 120 h de fermentação em agitador orbital



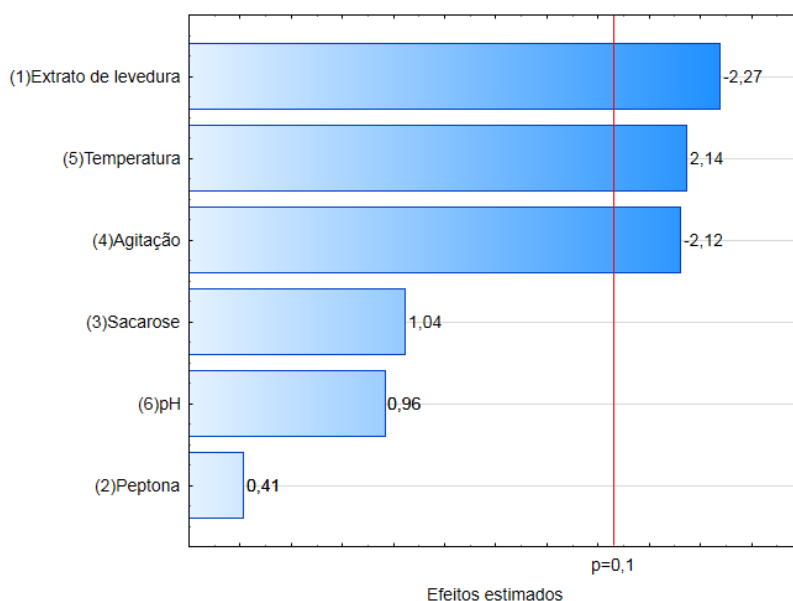
A Figura 5 apresenta os efeitos ( $p < 0,1$ ) das variáveis independentes no teor de ácidos graxos saturados. A produção de ácidos graxos saturados variou de 31,18% (ensaio 12) a 43,11% (ensaio 8). O efeito negativo da concentração de extrato de levedura é um indicativo da influência do meio na produção de SFA. A agitação apresentou efeito positivo na produção de SFA, este resultado pode estar associado ao fato de maior oxigenação no meio. A temperatura, pH, sacarose e peptona não apresentaram influência na produção de ácidos graxos saturados.

Figura 5 - Gráfico de Pareto demonstrando o efeito das variáveis na produção de SFA após 120 h de fermentação em agitador orbital.



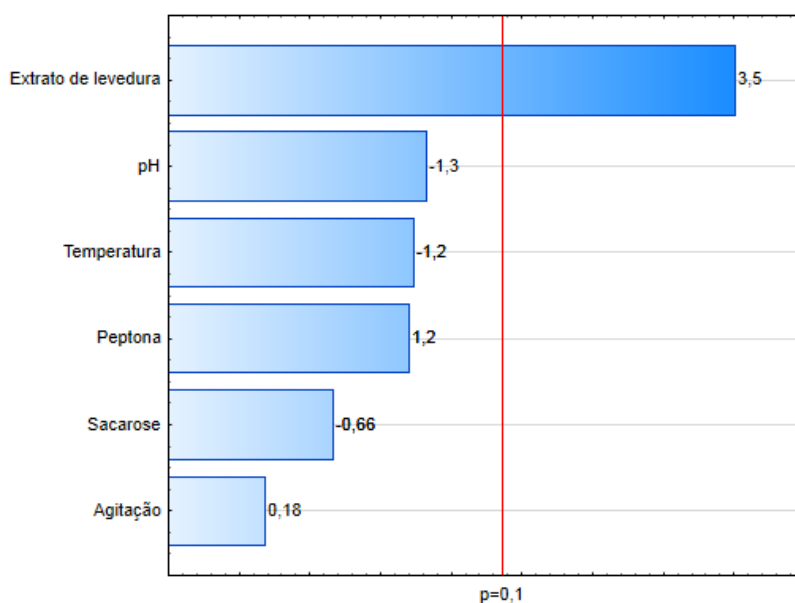
A Figura 6 apresenta os efeitos ( $p < 0,1$ ) das variáveis independentes no teor de ácidos graxos monoinsaturados. A produção de MUFAs variou de 45,87% (ensaio 4) a 55,61% (ensaio 6). A temperatura apresentou efeito significativo positivo na produção de MUFAs, já as variáveis extrato de levedura e agitação apresentaram efeito negativo. As demais variáveis (sacarose, pH e peptona) não apresentaram influência significativa no teor de MUFAs.

Figura 6 - Gráfico de Pareto demonstrando o efeito das variáveis na produção de MUFAs após 120 h de fermentação em agitador orbital.



A Figura 7 apresenta os efeitos das variáveis independentes na produção de PUFAs e somente o extrato de levedura teve efeito significativo ( $p < 0,1$ ), sendo este efeito positivo sobre a produção de PUFAs, ou seja, aumentando a concentração de extrato de levedura no meio de cultura, maior será o percentual de PUFAs produzidos. O extrato de levedura é a principal fonte de nitrogênio para o meio de fermentação e a importância do aporte adequado para a produção de PUFAs tem sido demonstrada em várias culturas de micro-organismos (Otero et al., 1997; Wen e Feng, 2001; Yokochi et al., 1998). As demais variáveis não apresentaram efeito significativo no acúmulo de PUFAs.

Figura 7 - Gráfico de Pareto demonstrando o efeito das variáveis na produção de PUFAs após 120 h de fermentação em agitador orbital



Na Tabela 6 estão apresentados os perfis dos AG correspondentes aos experimentos do planejamento Plackett-Burman. Os AG majoritários obtidos foram: ácido oléico (C18:1n9c) da família n-9 seguido do ácido palmítico (C16:0) um AG saturado e o ácido linoléico (C18:2n6c) da família n-6. O teor destes AG variou entres os experimentos do planejamento, como uma conseqüência da variação das condições do meio de cultivo, pois quando

somente a sacarose estava presente o acúmulo de ácido linoléico foi 2,28%, e quando a sacarose, extrato de levedura e a peptona estavam presentes o acúmulo chegou a 12,88%.

Um dos resultados mais promissores deste estudo é o acúmulo do ácido ALA (C18:3n3), EPA (C20:5n3) e DHA (C22:6n3), o qual são AG da família n-3. Os AG da família n-6 produzidos foram o ácido linoléico (C18:2n6c) e o ácido  $\gamma$ -linolênico (C18:3n6). O acúmulo de PUFAs também foi observado por Zeng et al., (2013) a partir do cultivo da cepa *Mortierella isabellina* com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. O teor de PUFAs chegou a 21,97%, sendo que os AG produzidos em maior quantidade foram da família n-6 com 14,74 % de linoléico (C18: 2n6) e 6,3 % de  $\gamma$ -linoleico (C18:3n6).



Tabela 6 - Perfil dos ácidos graxos obtidos nos experimentos do planejamento Plackett-Burman.

| Ensaio | C14:0      | C15:0       | C16:0             | C16:1       | C17:0      | C17:1       | C18:0       | C18:1n9c     | C18:2n6c     | C18:3n6     | C18:3n3     | C20:0       | C20:1n9     | C20:2       | C20:5n3 | C22:0       | C22:1n9     | C22:6n3     | C23:0 | C24:0       |
|--------|------------|-------------|-------------------|-------------|------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------|-------------|-------------|-------------|-------|-------------|
| 1      | 0,67       | 0,27        | 23,8<br>5         | 2,16        | 0,13       | 0,12        | 4,57        | 49,2         | 10,1         | 5,59        | 0,01        | 1,29        | 0,45        | 0,03        | -       | 0,45        | 0,07        | 0,47        | -     | 0,52        |
| 2      | <b>0,7</b> | <b>0,24</b> | <b>22,3<br/>9</b> | <b>1,63</b> | <b>0,1</b> | <b>0,18</b> | <b>5,06</b> | <b>45,89</b> | <b>12,88</b> | <b>9,04</b> | <b>0,08</b> | <b>0,55</b> | <b>0,19</b> | <b>0,04</b> | -       | <b>0,29</b> | <b>0,03</b> | <b>0,32</b> | -     | <b>0,44</b> |
| 3      | 1,02       | 0,4         | 24,2<br>7         | 2,2         | 0,17       | 0,31        | 4,31        | 52,47        | 6,86         | 6,49        | 0,08        | 0,4         | 0,16        | -           | -       | 0,27        | -           | 0,29        | -     | 0,39        |
| 4      | 0,71       | 0,25        | 23,0<br>1         | 1,87        | 0,11       | 0,09        | 5,49        | 45,44        | 12,17        | 8,33        | 0,09        | 0,86        | 0,38        | 0,05        | -       | 0,32        | 0,05        | 0,33        | 0,04  | 0,45        |
| 5      | 0,93       | 0,49        | 26,4<br>4         | 1,78        | 0,23       | 0,3         | 5,62        | 48,71        | 7,69         | 5,2         | 0,07        | 0,81        | 0,39        | 0,05        | -       | 0,37        | 0,02        | 0,26        | 0,02  | 0,69        |
| 6      | 1,09       | 0,36        | 21,9<br>5         | 2,24        | 0,19       | 0,41        | 4,85        | 55,17        | 7,25         | 4,66        | 0,09        | 0,58        | 0,42        | -           | -       | 0,22        | 0,02        | 0,16        | -     | 0,34        |
| 7      | 0,93       | 0,32        | 29,0<br>7         | 1,94        | 0,06       | 0,17        | 5,32        | 53,21        | 3,35         | 0,74        | 0,04        | 1,94        | 0,35        | 0,53        | -       | 0,57        | 0,06        | 0,36        | 0,03  | 0,95        |
| 8      | 0,92       | 0,32        | 30,1<br>4         | 1,86        | 0,17       | 0,18        | 7,33        | 52,21        | 2,28         | 1,62        | 0,09        | 1,15        | 0,37        | -           | -       | 0,52        | 0,13        | 0,24        | -     | 0,51        |
| 9      | 0,92       | 0,38        | 28,0<br>1         | 1,82        | 0,15       | 0,2         | 5,02        | 51,27        | 6,18         | 2,07        | 0,06        | 1,6         | 0,42        | 0,48        | 0,9     | 0,41        | 0,04        | 0,28        | -     | 0,65        |
| 10     | 1,02       | 0,41        | 24,3<br>2         | 2,17        | 0,17       | 0,3         | 5,17        | 51,77        | 6,99         | 5,16        | -           | 0,86        | 0,42        | 0,1         | -       | 0,28        | 0           | 0,28        | -     | 0,58        |
| 11     | 0,91       | 0,33        | 26,5<br>20,1      | 2,11        | 0,14       | 0,2         | 5,9         | 50,51        | 5,01         | 6,12        | 0,08        | 0,75        | 0,31        | -           | -       | 0,28        | 0,05        | 0,34        | -     | 0,45        |
| 12     | 0,55       | 0,17        | 20,1<br>9         | 2,06        | 0,07       | 0,15        | 4,76        | 52,37        | 9,24         | 5,7         | 0,1         | 1,58        | 0,39        | 0,06        | -       | 0,72        | 0,13        | 0,88        | 0,01  | 0,92        |
| 13     | 0,63       | 0,22        | 22,9<br>1         | 2,06        | 0,09       | 0,13        | 5,57        | 50,07        | 9,37         | 4,89        | 0,11        | 1,73        | 0,35        | 0,07        | -       | 0,56        | 0,09        | 0,47        | -     | 0,7         |
| 14     | 0,58       | 0,19        | 22,3<br>2         | 1,7         | 0,08       | 0,11        | 5,19        | 50,51        | 9,46         | 4,55        | 0,04        | 2,44        | 0,33        | 0,02        | -       | 0,84        | 0,1         | 0,57        | -     | 0,98        |
| 15     | 0,56       | 0,17        | 21,7<br>7         | 1,55        | 0,08       | 0,09        | 7,92        | 48,59        | 9,45         | 3,97        | 0,05        | 2,51        | 0,31        | 0,05        | -       | 0,95        | 0,11        | 0,68        | -     | 1,18        |

C14:0 - (Ácido Mirístico); C15:0 - (Ácido Pentadecanóico); C16:0 - (Ácido Palmítico); C16:1 - (Ácido Palmitoléico); C17:0 - (Ácido Heptadecanóico); C17:1 - (ácido heptadecenoico); C18:0 - (Ácido Estearico); C18:1n9c - (Ácido Oléico); C18:2n6c - (Ácido Linoléico); C18:3n6 - (Ácido  $\gamma$ -linolênico); C18:3n3 - (Ácido  $\alpha$ -linolênico, ALA); C20:0 - (Araquídico); C20:1n9 - (Ácido cis-11-Eicosenóico); C20:2 cis-11,14 - (Eicosadienóico); C20:5n3 (ácido eicosapentaenoico, EPA); C22:0 - (Ácido Behênico); C22:1n9 - (Ácido Erúcico); C22:6n3-(ácido docosaexaenóico, DHA).C23:0 - (Ácido Tricosanóico); C24:0 - (ácido lignocérico).

### 5.1.1 Avaliação da concentração de extrato de levedura na produção de PUFAs

Na Tabela 7 estão apresentados o teor de lipídeos e a concentração dos AG acumulados nos ensaios realizados com diferentes concentrações de extrato de levedura, sendo as demais variáveis, peptona (1,5 g.L<sup>-1</sup>), sacarose (1,5 g.L<sup>-1</sup>), agitação (200 rpm), temperatura (24°C) e pH (5,0) mantidas fixas na condição de maior produção de PUFAs definida no planejamento Plackett-Burman (ensaio 2). Através destes resultados pode-se verificar que o aumento da concentração de extrato de levedura está diretamente relacionado com o aumento da concentração de PUFAs. A produção de PUFAs atingiu 28,17% quando a concentração de extrato de levedura foi 3,75 g.L<sup>-1</sup>, correspondendo a um aumento 6,89% em relação aos resultados obtidos no planejamento experimental. O acúmulo de lipídeos nas amostras variou de 3,7% a 4,79% e não foram influenciados pelo aumento da concentração de extrato de levedura.

Ruan et al. (2012) analisaram condições fixas de nitrogênio (2,74 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura), agitação de 180 rpm e 25°C, resultando em 21,6 g.L<sup>-1</sup> de produção em massa de células e teor de lipídeos 8,8 g.L<sup>-1</sup> para o fungo *Mortierella isabellina* ATCC42613.

Através da análise estatística, pode-se verificar que as produções de PUFAs e MUFAs não tiveram efeito significativo a 95% de confiança pelo teste de Tukey. Já o teor de lipídeos e SFA, apresentaram diferença estatística entre os ensaios I e IV.

Tabela 7 - Influência das diferentes concentrações de extrato de levedura no acúmulo de lipídeos, e AG (SFA, MUFAs e PUFAs).

| Ensaio    | Extrato de levedura (g.L <sup>-1</sup> ) | Teor de lipídeos (%)          | ΣSFA (%)                        | ΣMUFA (%)                       | ΣPUFA (%)                       |
|-----------|--|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| I         | 1,50                                     | 4,01 ± 4,86 <sup>a</sup>      | 29,95 ± 1,68 <sup>a</sup>       | 48,77 ± 2,29 <sup>a</sup>       | 21,28 ± 3,97 <sup>a</sup>       |
| II        | 2,25                                     | 4,79 ± 0,44 <sup>a, b</sup>   | 31,26 ± 0,06 <sup>a, b</sup>    | 46,11 ± 0,06 <sup>a</sup>       | 22,63 ± 0,13 <sup>a</sup>       |
| III       | 3,00                                     | 3,7 ± 1,86 <sup>a, b</sup>    | 30,55 ± 2,02 <sup>a, b</sup>    | 44,86 ± 2,18 <sup>a</sup>       | 24,59 ± 0,16 <sup>a</sup>       |
| <b>IV</b> | <b>3,75</b>                              | <b>4,03 ± 0,4<sup>b</sup></b> | <b>29,66 ± 0,84<sup>b</sup></b> | <b>42,17 ± 1,00<sup>a</sup></b> | <b>28,17 ± 0,13<sup>a</sup></b> |

Letras iguais resultados não diferem entre si, a nível de 95% de confiança pelo Teste de Tukey.

Para avaliar o potencial do lipídeo produzido foi determinado o perfil de ácidos graxos (Tabela 8). Em todos os ensaios, observou-se que o ácido oléico (C18:1n9) foi o AG intracelular dominante, seguido do ácido palmítico (C16:0) e do ácido linoléico (C18:2n6c). O ácido linoléico e o ácido  $\gamma$ -linolênico (C18:3n6) são AG da família n-6 e sua maior concentração foi 15,09% e 12,53%, respectivamente. O EPA (C20:5n3), AG da família n-3 esteve presente em todos os ensaios com maior percentual de 0,65%. Comparando o perfil dos AG com os obtidos na etapa anterior, verifica-se a ausência dos ácidos ALA e DHA, mas em contrapartida a presença de EPA (n-3) e maiores concentrações dos ácidos linoléico e  $\gamma$ -linolênico (n-6).

Wen e Feng (2001) pesquisaram diferentes fontes de nitrogênio para a produção de ácido eicosapentaenóico (EPA), obtendo um teor de 2,74% em uma concentração de triptona ( $1,6\text{g g.L}^{-1}$ ) e extrato de Levedura ( $0,8\text{ g.L}^{-1}$ ). Vadivelan e Venkateswaran (2014) utilizaram espécies de *Mortierella* na produção de AG, tendo obtido no cultivo de *Mortierella alpina* 5,58% de n-3 e no cultivo de *Mortierella exigus* 7,17% de n-6.

Tabela 8 - Perfil de AG obtidos nas diferentes concentrações de extrato de levedura.

| Ensaio   | I     | II    | III   | IV           |
|----------|-------|-------|-------|--------------|
| C13:0    | 0,56  | 0,67  | 0,66  | <b>0,61</b>  |
| C15:0    | 0,22  | 0,24  | 0,22  | <b>0,23</b>  |
| C16:0    | 21,52 | 23,00 | 22,24 | <b>21,97</b> |
| C16:1    | 1,63  | 1,67  | 1,60  | <b>1,67</b>  |
| C17:0    | 0,11  | 0,11  | 0,13  | <b>0,13</b>  |
| C18:0    | 4,75  | 4,73  | 4,99  | <b>4,40</b>  |
| C18:1n9t | 0,52  | 0,57  | 0,54  | <b>0,43</b>  |
| C18:1n9c | 47,47 | 44,77 | 43,50 | <b>41,07</b> |
| C18:2n6c | 12,77 | 12,62 | 13,62 | <b>15,09</b> |
| C18:3n6  | 7,87  | 9,36  | 10,33 | <b>12,53</b> |
| C20:0    | 0,87  | 0,59  | 0,51  | <b>0,47</b>  |
| C20:1n9  | 0,38  | 0,37  | 0,39  | <b>0,33</b>  |
| C20:5n3  | 0,64  | 0,65  | 0,64  | <b>0,55</b>  |
| C22:0    | 0,30  | 0,23  | 0,20  | <b>0,18</b>  |
| C24:1n9  | 0,41  | 0,40  | 0,42  | <b>0,33</b>  |

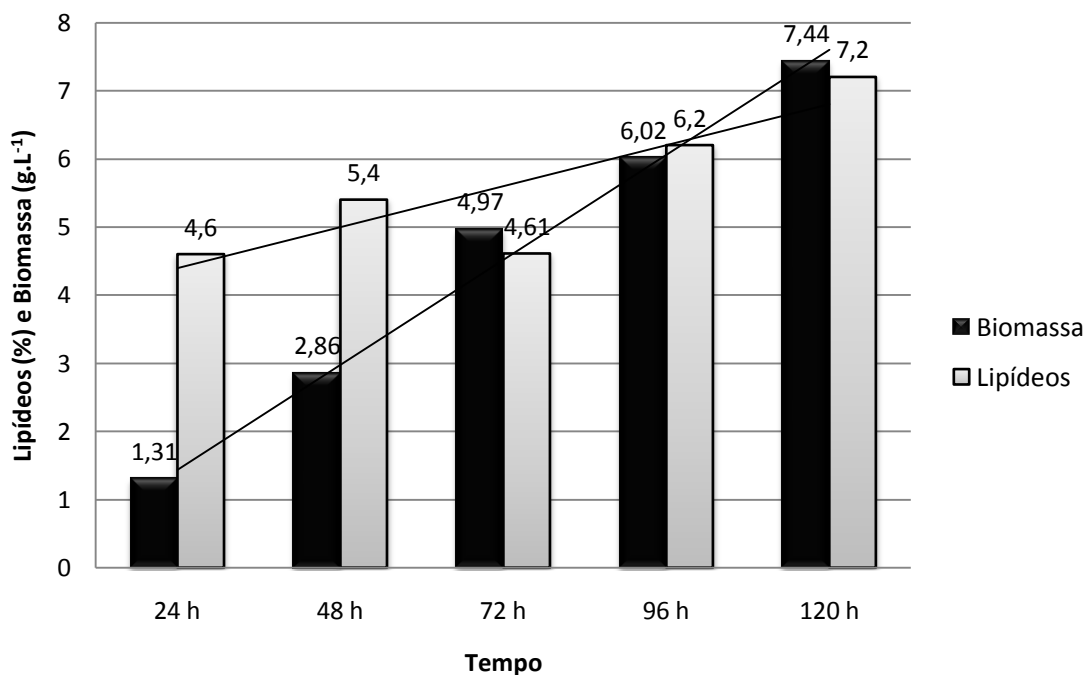
C13:0 – (Ácido Tridecanóico); C15:0 - (Ácido Pentadecanóico); C16:0 - (Ácido Palmítico); C16:1 - (Ácido Palmitoléico); C17:0 - (Ácido Heptadecanóico); C18:0 - (Ácido Esteárico); C18:1n9t – (Ácido eláídico); C18:1n9c - (Ácido Oléico); C18:2n6c - (Ácido Linoléico); C18:3n6 - (Ácido  $\gamma$ -linolênico); C20:0 - (Araquídico); C20:1n9 - (Ácido cis-11-Eicosenóico); C20:5n3 (ácido eicosapentaenóico, EPA); C22:0 – (Ácido Behênico); C24:1n9 – (Ácido Nervonico).

### 5.1.2 Cinética de crescimento

Após a otimização do meio fermentativo a fim de investigar a melhor produção de PUFAs, foi realizada uma cinética de crescimento durante 120 horas. O meio de crescimento ( $3,75 \text{ g.L}^{-1}$  extrato de levedura,  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$  peptona e  $50 \text{ g.L}^{-1}$  sacarose) e parâmetros de fermentação (200 rpm agitação,  $28^\circ\text{C}$  temperatura e 5,0 pH) utilizados, foram os mesmos do ensaio com maior acúmulo de PUFAs, após o aumento da concentração de extrato de levedura. Na Figura 8 observa-se que o crescimento da biomassa fúngica da *Mortierella isabellina* foi crescente ao longo das 120 horas de fermentação, com  $1,31 \text{ g.L}^{-1}$  nas primeiras 24 horas e chegou a  $7,44 \text{ g.L}^{-1}$  (120 h). A produção de lipídios variou de 4,6% nas primeiras 24 horas até 7,2% após 120 horas de fermentação.

Ruan et al. (2015) estudaram a produção de biomassa e a concentração de lipídios a partir da fermentação da cepa *Mortierella isabellina*, que atingiu  $8,6 \text{ g.L}^{-1}$  e  $1,78 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente, nas primeiras 34 horas de fermentação. A concentração de massa celular e lipídeos aumentou para  $11,0 \text{ g.L}^{-1}$  e  $4,14 \text{ g.L}^{-1}$  respectivamente em 70 horas.

Figura 8 - Produção de lipídios e biomassa ao longo das 120 horas de fermentação



## 5.2 FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR STR

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos no delineamento composto central (DCC) para duas variáveis independentes (aeração e agitação). As respostas avaliadas foram concentração de biomassa, teores de lipídeos, SFA, MUFAs e PUFAs.

O acúmulo de biomassa foi crescente ( $6,3 \text{ g.L}^{-1}$  a  $15,12 \text{ g.L}^{-1}$ ) conforme a agitação e aeração foram maiores. Os pontos centrais (ensaios 5, 6 e 7) apresentaram a maior produção de PUFAs e menor de produção de SFA e quando a agitação e aeração foi a menor (40 rpm e 1 vvm, respectivamente) diminuiu o acúmulo de PUFAs (6,89%) e MUFAs (35,76%), e beneficiou o acúmulo de SFA (57,36%).

Os dados da Tabela 9 foram usados para o cálculo do efeito das variáveis independentes sobre cada uma das respostas, mostrado através dos gráficos de Pareto.

Tabela 9 - Matriz experimental para avaliar a influência da agitação e aeração na produção de PUFAs após 120h de fermentação em biorreator STR.

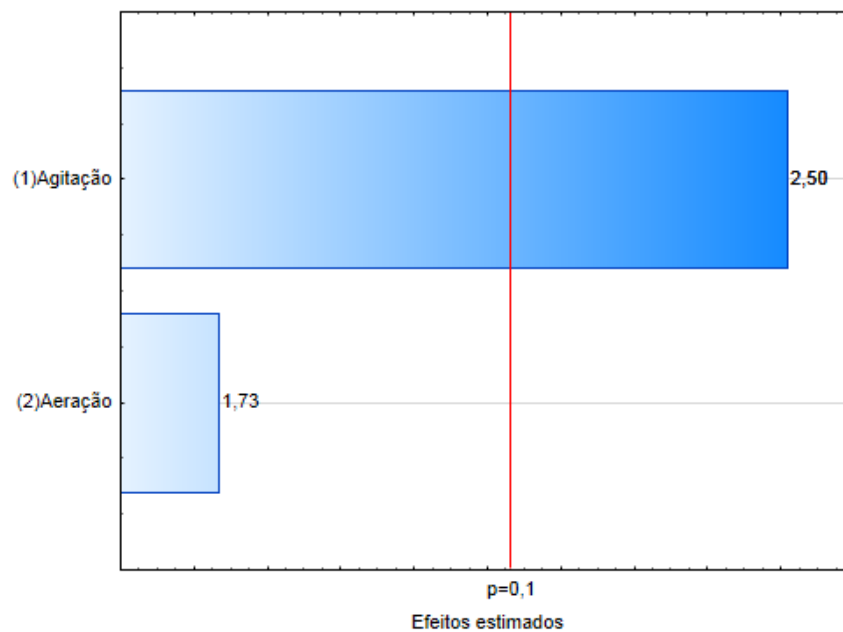
| Ensaios | Agitação (rpm) | Aeração (vvm) | Biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) | Teor de lipídios (%) | $\Sigma$ SFA (%) | $\Sigma$ MUFAs (%) | $\Sigma$ PUFAs (%) |
|---------|----------------|---------------|--------------------------------|----------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| 1       | 40 (-1)        | 1 (-1)        | 6,3                            | 6,49                 | 57,36            | 35,76              | 6,89               |
| 2       | 60 (1)         | 1 (-1)        | 7,45                           | 7,4                  | 40,76            | 38,50              | 20,74              |
| 3       | 40 (-1)        | 3(1)          | 5,84                           | 6,92                 | 35,94            | 46,38              | 17,69              |
| 4       | 60(1)          | 3(1)          | 15,12                          | 4,11                 | 36,06            | 40,67              | 23,27              |
| 5       | 50 (0)         | 2 (0)         | 9,17                           | 6,08                 | 32,94            | 40,93              | 26,13              |
| 6       | 50 (0)         | 2 (0)         | 7,95                           | 7,0                  | 34,90            | 40,76              | 24,34              |
| 7       | 50 (0)         | 2 (0)         | 8,56                           | 6,54                 | 33,92            | 40,84              | 25,23              |

$\Sigma$ SFA - (Somatória dos ácidos graxos saturados);  $\Sigma$ MUFA - (Somatória dos ácidos graxos monoinsaturados);  $\Sigma$ PUFA - (Somatória dos ácidos graxos poli-insaturados)

A Figura 9 apresenta os efeitos das variáveis independentes (agitação e aeração) na produção de biomassa, estas apresentaram efeito positivo, no entanto nenhum foi estatisticamente significativo ( $p < 0,1$ ). De acordo com a Tabela 9, observa-se que a maior concentração de biomassa foi  $15,12 \text{ g.L}^{-1}$  (ensaio 4) e a

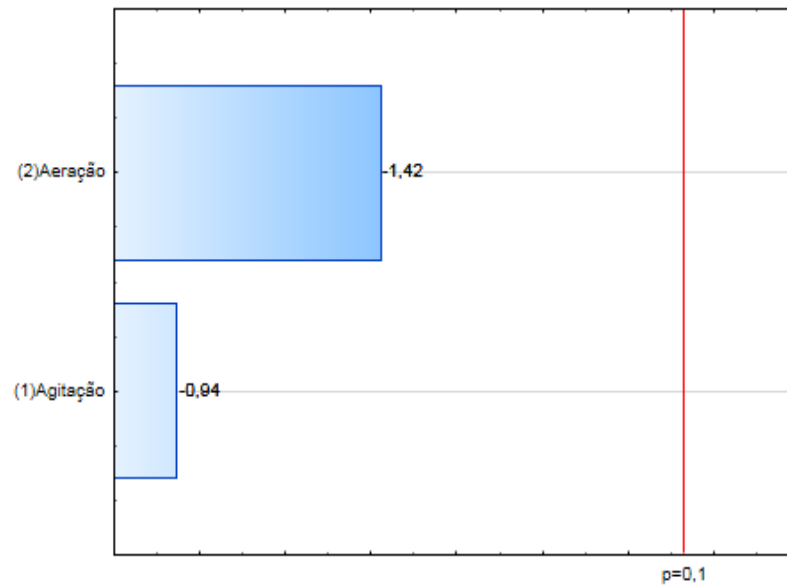
menor concentração foi  $6,3 \text{ g.L}^{-1}$  (ensaio 1). Comparando estes resultados com aqueles obtidos na etapa anterior (fermentação em shaker), a produção de biomassa foi 2,1 vezes maior quando produzida em biorreator STR, com os mesmos componentes do meio.

Figura 9 - Gráfico de Pareto demonstrando o efeito das variáveis na produção de biomassa após 120 h de fermentação em biorreator STR.



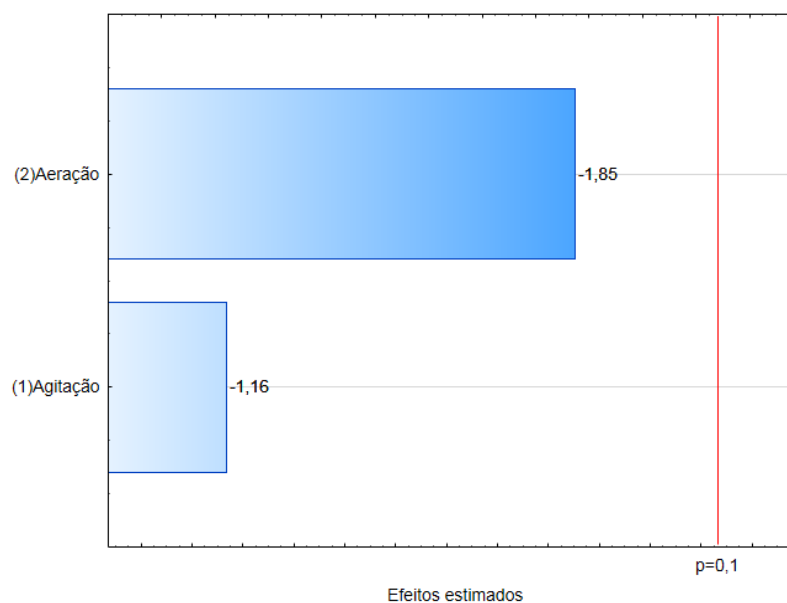
A Figura 10 apresenta os efeitos das variáveis independentes no teor de lipídeos totais, tanto agitação como aeração não apresentaram efeito ( $p < 0,1$ ) sobre a resposta avaliada. A produção de lipídios totais (Tabela 9) variou de 4,11% (ensaio 4) a 7,4% (ensaio 2). Comparando estes resultados com aqueles obtidos na etapa anterior (fermentação em shaker), foi verificado que houve um aumento no teor de lipídios. Este aumento pode estar associado à maior oxigenação e homogeneização do meio durante o processo de fermentação.

Figura 10 - Gráfico de Pareto demonstrando o efeito das variáveis na produção de lipídeos totais após 120 h de fermentação em biorreator STR.



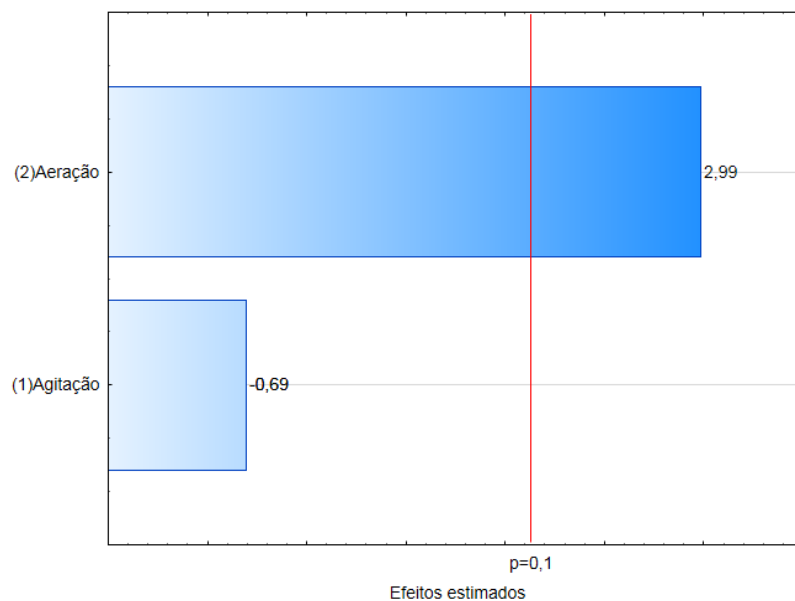
A Figura 11 apresenta os efeitos das variáveis independentes no teor de ácidos graxos saturados, nenhuma das variáveis teve efeito significativo sobre a produção de ácidos graxos saturados. A produção de ácidos graxos saturados variou de 32,94% (ensaio 5) a 57,36% (ensaio 1).

Figura 11 - Gráfico de Pareto demonstrando o efeito das variáveis na produção de SFA após 120 h de fermentação em biorreator STR.



A Figura 12 apresenta os efeitos das variáveis independentes no teor de ácidos graxos monoinsaturados e somente a aeração teve efeito significativo ( $p < 0,1$ ), sendo este efeito positivo. A produção de MUFAs variou de 35,76% (ensaio 1) a 46,38% (ensaio 3).

Figura 12 - Gráfico de Pareto demonstrando o efeito das variáveis na produção de MUFAs após 120 h de fermentação em biorreator STR.

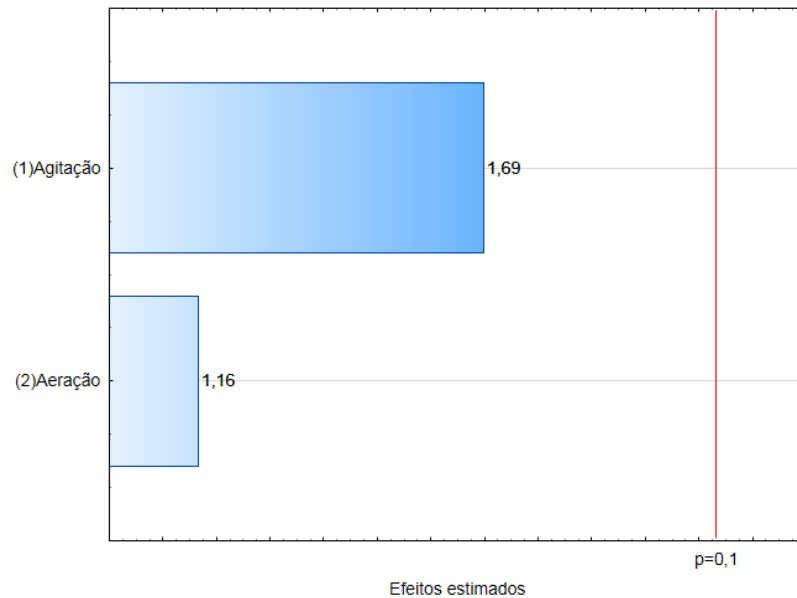


A Figura 13 apresenta os efeitos das variáveis independentes (agitação e aeração) na produção de PUFAs nenhuma das variáveis nas faixas estudadas apresentou efeito significativo sobre a resposta. O maior teor de PUFAs foi 26,13 % (ensaio 5), comparando estes resultados com aqueles obtidos na etapa anterior (fermentação em agitador orbital), verifica-se que a produção diminuiu em 2,04%.

Este efeito pode estar relacionado ao tipo de biorreator, pois mesmo que o biorreator STR seja o mais utilizado em trabalhos, não é o mais adequado para o cultivo de fungos. Royse (1987) observou que o grau de agitação em muitos casos pode causar danos as estruturas vegetativas devido à zona de cisalhamento das pás do agitador.



Figura 13 - Gráfico de Pareto expressando os efeitos das variáveis independentes na concentração de PUFAs



A Tabela 10 apresenta o perfil dos AG produzidos em biorreator STR. Observa-se que os AG majoritários (oléico, palmítico e linoléico) são os mesmos produzidos na etapa de aumento da concentração de extrato de levedura. Os AG da família n-6 variou de 6,89% (ensaio 1), onde é observada a menor agitação e aeração do meio, a 25,87% (ensaio 5) maior agitação e aeração do meio. O ácido DHA (C22:6n3) da família n-3 esteve em pequena quantidade. É observado que somente o ensaio 1 teve ausência do ácido DHA, este resultado pode estar associado a menor agitação e aeração do meio de fermentação.

Kiran et al. (2013) estudaram um processo alimentado em biorreator para a obtenção de óleo microbiano. A fermentação em estado sólido foi suplementada com glicerol no início do processo e a cada 24 h para manter a relação C/N na faixa de 70-90. A fermentação ocorreu durante 72 horas, obtendo um rendimento de 41% de lipídeos. Amaretti et al. (2010) obtiveram um rendimento de 68% de lipídeos, utilizando diferentes temperaturas em biorreator (2,0 L). Para aumentar a produção de PUFAs foi utilizada a glicose ( $120 \text{ g.L}^{-1}$ ) e a temperatura de  $20^\circ \text{C}$  foi considerada ótima para o crescimento de micro-organismos.

Tabela 10 - Perfil dos ácidos graxos obtidos no delineamento composto central 2<sup>2</sup> (DCC).

| Ensaio   | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| C10:0    | 0,66  | 0,13  | -     | -     | -     | 0,07  | 0,04  |
| C11:0    | -     | 0,09  | -     | -     | -     | 0,06  | 0,03  |
| C12:0    | 1,50  | 0,19  | -     | -     | -     | 0,16  | 0,08  |
| C13:0    | 0,80  | 0,09  | -     | -     | -     | 0,09  | 0,05  |
| C14:0    | 3,56  | 1,04  | 0,84  | 0,90  | 0,85  | 0,32  | 0,58  |
| C14:1    | -     | 1,10  | -     | -     | -     | -     | -     |
| C15:0    | -     | -     | 0,72  | 0,46  | 0,33  | 0,18  | 0,25  |
| C16:0    | 37,51 | 25,85 | 25,23 | 23,83 | 23,32 | 24,44 | 23,88 |
| C16:1    | 3,22  | 1,89  | 1,71  | 1,71  | 2,01  | 1,98  | 2,00  |
| C17:0    | -     | 0,48  | 0,25  | 0,20  | 0,17  | 0,35  | 0,26  |
| C17:1    | -     | 0,37  | 0,43  | 0,30  | 0,23  | -     | 0,11  |
| C18:0    | 9,61  | 8,34  | 5,26  | 7,39  | 5,08  | 5,87  | 5,47  |
| C18:1n9c | 35,46 | 38,22 | 45,93 | 40,28 | 40,59 | 40,50 | 40,54 |
| C18:2n6c | 6,31  | 11,16 | 10,29 | 13,36 | 14,68 | 12,40 | 13,54 |
| C18:3n6  | 0,58  | 9,42  | 7,14  | 9,67  | 11,19 | 11,49 | 11,34 |
| C20:0    | 0,50  | 0,60  | 0,69  | 0,53  | 0,42  | 0,58  | 0,50  |
| C20:1n9  | 0,30  | 0,28  | 0,45  | 0,39  | 0,34  | 0,26  | 0,30  |
| C22:0    | -     | 0,18  | 0,34  | 0,28  | 0,20  | 0,22  | 0,21  |
| C22:6n3  | -     | 0,16  | 0,25  | 0,24  | 0,26  | 0,45  | 0,35  |
| C24:0    | -     | 0,40  | 0,47  | 0,45  | 0,34  | 0,58  | 0,46  |

C10:0 – (Ácido Cáprico); C11:0 - (Ácido Hendecanoico); C12:0 – (Ácido Láurico); C13:0 – (Ácido Isomirístico); C14:0 - (Ácido Mirístico); C14:1 - (Ácido Miristoléico); C15:0 - (Ácido Pentadecanoico); C16:0 - (Ácido Palmítico); C16:1 - (Ácido Palmitoléico); C17:0 - (Ácido Margárico); C17:1 - (Ácido Heptadecenoico); C18:0 - (Ácido Esteárico); C18:1n9c - (Ácido Oléico); C18:2n6c - (Ácido Linoléico); C18:3n6 - (Ácido  $\gamma$  -linolênico); C20:0 - (Araquídico); C20:1n9 - (Ácido cis-11-Eicosenóico); C22:0 - (Ácido Behênico); C22:6n3 - (Ácido Docosaecaenóico, DHA); C24:0 - (Ácido Lignocérico).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos no planejamento experimental Plackett-Burman somente a variável extrato de levedura foi significativa ( $p < 0,1$ ) na produção de PUFAs em agitador orbital. Dentre os 15 ensaios realizados, as condições do ensaio 2 (1,5 g.L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 1,5 g.L<sup>-1</sup> peptona e 50 g.L<sup>-1</sup> sacarose, 200 rpm agitação, 28°C temperatura e 5,0 pH) proporcionou maior percentagem de PUFAs (22,32%). O acúmulo de lipídeos variou de 3,22% a 12,77% e nenhuma variável foi estatisticamente significativa. A variável temperatura, extrato de levedura e agitação apresentaram efeitos significativos ( $p < 0,1$ ) na produção de MUFAs. O perfil dos AG obtidos nesta etapa foram promissores, pois foram identificados AG da família n-3 (ALA, EPA e DHA) e da família n-6 (ácido linoléico e o ácido  $\gamma$ -linolênico).

O aumento da concentração de extrato de levedura possibilitou um aumento na concentração de PUFAs, sendo produzidos 28,17%, resultados estes obtidos utilizando 3,75 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura. O acúmulo de biomassa fúngica e lipídeos totais foram crescentes ao longo das 120 horas de fermentação chegando a 7,44 g.L<sup>-1</sup> e 7,2 %, respectivamente. A presença do ácido graxo EPA (n-3) e maiores acúmulos dos ácidos n-6, linoléico (15,09%) e  $\gamma$ -linolênico (12,53%), foram verificadas após o aumento da concentração de extrato de levedura.

Os resultados da fermentação em biorreator do tipo STR obtidos no delineamento composto central, mostraram que as variáveis agitação e aeração não tiveram influência significativa ( $p < 0,1$ ) sobre a concentração de lipídeos totais, SFA e PUFAs dentro das faixas avaliadas. Já a agitação e aeração foram estatisticamente significativas para concentração de biomassa e MUFAs. O maior acúmulo de biomassa foi 15,12 g.L<sup>-1</sup> e de lipídeos foi 7,4%. A produção de PUFAs atingiu 26,13% sendo que estes AG foram: DHA, ácido Linoléico e o ácido  $\gamma$ -linolênico.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar as condições de cultivo para maior acúmulo de EPA e DHA, através da diferentes formas de condução da fermentação;
- Redução de custos do processo através da substituição da sacarose para resíduo como o glicerol;
- Avaliar diferentes métodos de extração de lipídeos da biomassa microbiana;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, S.U.; SINGH, S.K.; PANDEY, A.; KANJILAL, S.; PRASAD, R.B.N. Effects of various process parameters on the production of  $\gamma$ -linolenic acid in submerged fermentation. **Food Technology Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 283-287, 2006.
- AMARETTI, A.; RAIMONDI, S.; SALA, M.; RONCAGLIA, L.; DE LUCIA, M.; LEONARDI, A.; ROSSI, M. 2010. Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. **Microbial cell Factories**, v. 9, p 73.
- BADAWI, N.; RONHEDE, S.; OLSSON, S.; et al. Metabolites of the phenylurea herbicides chlorotoluron, diuron, isoproturon and linuron produced by the soil fungus *Mortierella* sp. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 2806-2812, 2009.
- BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; et al. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, v. 48, n. 6, p. 375–87, 2009.
- BEOPOULOS, A.; NICAUD, J.-M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 1193–206, 2011.
- BIJL, H.L.; WOLF, J.H.; SCHAAP, A.; VISSER, J.M.J. Microbial polyunsaturated fatty acid containing oil from pasteurized biomass. US Patent no. 5340594. 2001. **Review Microbiological**, Philadelphia, 20, 285-328, 1994.
- BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; B., R.-D. M. A. Método de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 849–854, 2009.
- CAO, Y., CAO, Y., ZHAO, M. 2012. Biotechnological production of eicosapentaenoic acid: From a metabolic engineering point of view. *Process biochemistry*, 1320-1326.
- CARVALHO, O. P. **Produção de ácido gama linolênico por nova linhagem de *Mucor* sp e estudo das condições de fermentação**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.
- CARVALHO, P. DE O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75–80, 2003.
- CASTRO, A. M.; FERREIRA, J.R. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**. V. 33, n. 1,p.181-188, 2010.
- CERTIK, M.; SLAVIKOVA, L.; MASRNOVÁ, S.; SAJBIDOR, J. Enhancement of nutritional value of cereals with  $\gamma$ -linolenic acid by fungal solid-state fermentations. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, 44 (1), 75-82, 2006.

CHAUDHURI, S.; GHOSH, S.; BHATTACHARYYA, D.K.; BANDYOPADHYAY, S. Effect of mustard meal on the production of arachidonic acid by *Mortierella alengata* SC- 208. **JAOCs**, Chicago, 75 (8), 1998.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. **Compendium of Soil Fungi**. Vol 1., 159p., 1980.

CHATZIFRAGKOU, A., FAKAS, S., GALIOTOU-PANAYOTOU, M., KOMAITIS, M., AGGELIS, G., PAPANIKOLAOU, S., 2010. Commercial sugars as substrates for lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* fungi. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112, 1048–1057.

CHRISTIE, W.W. Analysis of complex lipid. **Lipid Analysis**, 2 ed., New York: Pergamon, p.107-134, 1982.

CLEMENTE, M.; STOCOCO, C.; MOCELIN, D.; FERNANDES, L. C. Ácidos graxos polinsaturados n-3 e sua ação sobre o sistema imunitário de indivíduos participantes de atividade física. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 1, n. 5, 2007.

CONNOR, W. E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 1 Suppl, p. 171S–5S, 2000.

DEMIR, M.; TURHAN, I.; KUCUKCETIN, A.; ALPKENT. Produção de petróleo por *Mortierella isabellina* a partir do soro tratado com lactase. **Tecnologia Biorresource**, v.128, p.365-369, 2013.

DIAS, R. C. E.; FARIA, A. F.; MERCADANTE, A. Z.; BRAGAGNOLO, N.; BENASSI, M. T. Comparison of extraction methods for kahweol and cafestol analysis in roasted coffee. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 24, n. 3, p. 492-499, 2013.

DYERBERG, J. Linolenate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. **Nutrition Reviews**, v. 44, n. 4, p. 125–134, 1986. The Oxford University Press.

ECONOMOU, C. N.; AGGELIS, G.; PAVLOU, S.; VAYENAS, D. V. Single cell oil production from rice hulls hydrolysate. **Biorresource Technology**, v. 102, n. 20, p. 9737–42, 2011.

ETHIER, S. E. Producing omega-3 polyunsaturated fatty acids from biodiesel waste glycerol by microalgae fermentation. Thesis Master of Science in biological systems engineering, Faculty of Virginia polytechnic institute and state university, Blacksburg, VA, 2010.

FAKAS, S.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; PAPANIKOLAOU, S.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G. Compositional shifts in lipids fractions during lipid turnover in *Cunninghamella echinulata*, **Enzyme and Microbial Technology**, New York, 40, 1321- 1327, 2007

FORNAZZARI, I. M.; RIBEIRO, G.; OLEGARIO, T. G.; TEREBEJZYK, J. Ácido graxo ômega-3 e a saúde humana. **V Semana de Tecnologia em Alimentos**, v. 90(2), p. 01-10, 2007.

GAO, D.; ZENG, J.; ZHENG, Y.; YU, X.; CHEN, S. Microbial lipid production from xylose by *Mortierella isabelina*. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 315–321, 2013.

GEMA, H.; KAVADIA A.; DIMOU, D.; TSAGOU, V.; AGGELI, M. E G. Produção de ácido gama-linolênico por *Cunninghamella echinulata* cultivadas em glicose e casca de laranja. **Applied Microbiol. Biotechnol.**, 58: 303-307, 2002.

GIBBS, P. A., SEVIOUR, R. J., SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 17-48, 2000.

GÓMEZ, C. C.; LÓPEZ, L. M. B.; KOHEN, V. L. Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health: nutritional recommendations. **Nutrición Hospitalaria**, v. 26, n. 2, p. 323–9, 2011.

GUERRERO, R.T. & SILVEIRA, R.M. B. **Glossorário ilustrado de Fungos**. p. 93 Porto Alegre: ed. Universidade/UFRGS, 1996.

HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 90, p. 420–426, 1978.

HERBERT, R.A.; KEITH, S.M. Microbiological production of essential fatty acids. United States **Efamol** 4851343. Disponível em: <http://www.freepatentsonline.com/4851343.html> . Acesso em: 15/12/2010

HOSOBUCH, M. AND H. YOSHIKAWA. 1999. Scale-up of microbial processes. In manual of industrial microbiology and biotechnology. ASM Press. 236-239.45:168–184.

JACKOWSKI, G.; MACSWEENEY, R.; SHAIKH, N.; YANTHA, J.; SCHINI-KERTH, V. Azetidione cholesterol absorption inhibitor (azetidinone) and omega 3 fatty acids (EPA, DHA, DPA) for the reduction of cholesterol and for reduction of cardiovascular events. , 23. Aug. 2012. US Patent WO 2012112511 A1.

JANG, H. D.; LIN, Y. .Y.; YANG, S. S. Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpine*. **Bioresource Technology**, v.96, p.1633–1644, 2005.

JEENNOR, S.; LAOTENG, K.; TANTICHAROEN, M.; CHEEVADHANARAK, S. Comparative fatty acid profiling of *Mucor rouxii* under different stress conditions. **FEMS Microbiology**. Amsterdam, 259, 60-66, 2006.

JINGYANG, X.; WEI, D.; XUEBING, Z.; GUOLING, Z.; DEHUA, L. Microbial oil production from various carbon sources and its use for biodiesel preparation. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 7, n. 1, p. 65–77, 2013.

KATAOKA, R., TAKAGI, K., SAKAKIBARA, F., 2011. Biodegradation of endosulfan by *Mortierella* sp. strain W8 in soil: Influence of different substrates on biodegradation. **Chemosphere** 85, 548- 552.

KIRAN, E. U.; TRZCINSKI, A.; WEBB, C. 2013. Microbial oil produced from biodiesel by-products could enhance overall production. **Bioresource Technology**, 129, 650 -654.

KLAIC, R. **Produção de bioherbicida por processos fermentativos a partir do fungo *Phoma* sp.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

KROMANN, N.; GREEN, A. Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. **Acta Medica Scandinavica**, v. 208, n. 5, p. 401–6, 1980.

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 Technology Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 73–79, 2008.

LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 5, p. 749–756, 2008.

LORGERIL, M.; RENAUD, S.; MAMELLE, N.; et al. Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. **Lancet**, v. 343, n. 8911, p. 1454–9, 1994.

MALAJOVICH M. A. **Biotecnologia**. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.

MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, n. 1, p. 1–5, 2009.

MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi--progress, obstacles and future trends. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 2, p. 177–85, 2008.

MULDER, E. G.; DEINEMA, M. H.; VAN VEEN, W. L.; ZEVENHUIZEN, L. P. T. M. Polysaccharides, lipids and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in microorganisms. Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas, **Leiden**, v. 81, p. 797–809, 1962.

NAGY, L.G., PETKOVITS, T., KOVÁCS, G.M., VOIGT, K., VÁGVÖLGYI, C., PAPP, T. Where is the unseen fungal diversity hidden? A study of *Mortierella* reveals a large contribution of reference collections to the identification of fungal environmental sequences. **New Phytologist**, v. 191, p. 789-794, 2011.

OJEDA, K; KAFAROV, V. Exergy analysis of enzymatic hidrolisis reactor for transformation of lignocellulosic biomass to bioethanol. **Chemical Engineering Journal**. v.154, p.390-395, 2009.



ONKEN, U.; WEILAND, P. Airlift fermenters: construction, behavior and uses. In: *Advances in Biotechnological Processes 1*. New York; Alan R. Liss, Inc., 1983, 67-95.

Otero, R., Garcia, D., Fábregas, J. Factors controlling eicosapentaenoic acid production in semicontinuous cultures of marine microalgae. **Journal of Applied Phycology**. V. 9, n. 5, p. 465-469. 1997.

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

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.

PAPANIKOLAOU, S.; DIAMANTOPOULOU, P.; CHATZIFRAGKOU, A.; PHILIPPOUSSIS, A.; AGGELIS, G. Suitability of low-cost sugars as substrates for lipid production by the fungus *Thamnidium elegans*. **Energ Fuel**, v.24, p.4078–4086, 2010.

PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; et al. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 1, p. 60–71, 2008.

PELLICCIA, F.; MARAZZI, G.; GRECO, C.; et al. Current evidence and future perspectives on n-3 PUFAs. **International Journal of Cardiology**, v. 170, n. 2 Suppl 1, p. S3–7, 2013.

POLI, J. S.; SILVA, M. A. N. DA; SIQUEIRA, E. P.; et al. Microbial lipid produced by *Yarrowia lipolytica* QU21 using industrial waste: a potential feedstock for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 320–6, 2014.

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

RUAN, Z.; ZANOTTI, Z.; WANG, X.; DUCEY, C.; LIU, Y. Evaluation of lipid accumulation from lignocellulosic sugars by *Mortierella isabellina* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v110, p 198–205, 2012

RUAN, Z.; HOLLINSHEAD, W.; ISAGUIRRE, C.; TANG, Y. J.; LIAO, W.; LIU, Y. Effects of inhibitory compounds in lignocellulosic hydrolysates on *Mortierella isabellina* growth and carbon utilization. **Bioresource Technology**, v183, p 18–24, 2015.

RUBIO-RODRÍGUEZ, N.; BELTRÁN, S.; JAIME, I.; et al. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. **Innovative Food Science &**

**Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2010.

SALICIS, F., KRIVOBOK, S., JACK, M., BENOIT-GUYOD, J.L.,. Biodegradation of fluoranthene by soil fungi. **Chemosphere** 38, 3031-3039, 1999.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, L. A. Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 895–906, 2012.

SCHUCHARDT, J. P.; HAHN, A. **Lifetime nutritional influences on cognition, behaviour and psychiatric illness**. Elsevier, 2011.

SERRANO, I.; ROSEIRO J. Ethanol-induced dimorphism and lipid composition changes in *Mucor fragilis* CCMI 142. **Letters in Applied Microbiology** v. 33,n.1, p.89-93, 2001.

SEKIKAWA, A.; DOYLE, M. F.; KULLER, L. H. Recent findings of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids (LCn-3 PUFAs) on atherosclerosis and coronary heart disease (CHD) contrasting studies in Western countries to Japan. **Trends in Cardiovascular Medicine**, 2015.

SCHMIDELL, Willibaldo; FACCIOTTI, Maria Cândida Reginato. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). *Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. p. 179-192. (Biotechnologia Industrial; v.2)

SILVA, G. K. B. **Produção de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) por *cunninghamella elegans* ucp 542 em substratos alternativos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

SILVA, T.L.; PINHEIRO, H.M.; ROSEIRO, J.C. Stress-induced morphological and physiological changes in  $\gamma$ -linolenic acid production by *Mucor fragilis* in batch and continuous cultures. **Enzyme Microbiology Technology**, New York, 32 (7), 880-888, 2003.

SIMOPOULOS, A. P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 60, n. 9, p. 502–7, 2006.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n. 6, p. 674–88, 2008.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541–549, 2010.

SHAW, R. The fatty acids of phycomycete fungi, and the significance of the gamma-linolenic acid component. **Comparative Biochemistry and Physiology**. p 325-331, 1966.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 100, n. 3, p. 1–49, 2013.

SOMASHEKAR, D.; VENMKATESHWARAN, G.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B.R. Effect of culture conditions on lipid and gamma-linolenic acid production by mucoraceous fungi. **Process Biochemistry**, London, **38**, 1719-1724, 2002.

SOXHLET, F. Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes. **Polytechnisches Journal**, Stuttgart, 232 (5), 461-465, 1879.

TANAMATI, A. A. C.; TANAMATI, A.; GANZAROLI, J. F.; SANCHEZ, J. L.; SILVA, M. S. Estudo comparativo de métodos de extração de lipídeos totais em amostras de origem animal e vegetal. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, Campo Mourão (PR), v.1, p.73-77, 2010.

TONATO, D. **Seleção de fungos filamentosos para produção de ácidos graxos poli-insaturados**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

TSIGIE, Y. A.; WANG, C.-Y.; TRUONG, C.-T.; JU, Y.-H. Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9216–22, 2011.

TUR, J. A.; BIBILONI, M. M.; SUREDA, A.; PONS, A. Dietary sources of omega 3 fatty acids: public health risks and benefits. **The British Journal of Nutrition**, v. 107 Suppl, p. S23–52, 2012.

URSIN, V.M.; VOELKER, T.; FROMAN, B. Fatty acid desaturases from fungi. United states Technology 20060156435. 2006.

VADIVELAN, G.; VENKATESWARAN, G. Production and enhancement of omega-3 fatty acid from *Mortierella alpina* CFR-GV15: Its food and therapeutic application. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

ROMEU VIANNI, R.; BRAZ-FILHO, R. Ácidos graxos naturais: importância e ocorrência em alimentos. **Química Nova**, v.19, n. 4, p.400-407, 1996.

XIAN, M.; NIE, J.; MEN, Q.; LIU, J.; ZHOU, C.; KANG, Y.; ZHEN, K. production of  $\gamma$ -linolenic acid by disrupted mycelia of *Mortierella isabelina*. **Letters Applied Microbiology**, London, 36, 182-185, 2003.

WELLBAUM, C. **Produção de ácidos graxos por linhagens de *mucor* spp. Isoladas de solo de área de Cerrado município de Corumbataí, Estado de São Paulo**. (Tese de doutorado), UNESP, 70p., 2006.

WEN, Z. Y., CHEN, F., 2001. Optimization of nitrogen sources for heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*. *Enzyme Microbial Technology*. V 29, P 341-347.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global status report on noncommunicable diseases 2014**. France, 2015.

WYNN, J.P.; HAMID, A.A.; LI, Y.; RATLEDGE, C. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. *Microbiology*, New York, 147, 2857-2864, 2001.

YATES, C. M.; CALDER, P. C.; ED RAINGER, G. Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 141, n. 3, p. 272–82, 2014.

YOKOCHI, T., HONDA, D., HIGASHIHARA, T., NAKAHARA, T. 1998. Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytriumlimacinum* SR21. *ApplMicrobiolBiotechnol*, v.49, p. 72-76.

ZENG, J.; ZHENG, Y.; YU, X.; YU, L.; GAO, D.; CHEN, S. A biomassa lignocelulósica como uma fonte de hidratos de carbono para a produção de lipídeos por *Mortierella isabelina*. *Tecnologia Bioresource*, v.128, p.385-391, 2013

ZHAO, G.; GAO, J.; LIANG, S.; et al. Study of the serum levels of polyunsaturated fatty acids and the expression of related liver metabolic enzymes in a rat valproate-induced autism model. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 44, p. 14–21, 2015.

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