

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

**Seleção de fungos filamentosos para produção de ácidos
graxos poli-insaturados**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DENISE TONATO

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

Seleção de fungos filamentosos para produção de ácidos graxos poli-insaturados

DENISE TONATO

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

ORIENTADOR: Dr. MARCIO ANTONIO MAZUTTI

CO-ORIENTADORA: Dra. RAQUEL CRISTINE KUHN

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**Seleção de fungos filamentosos para produção de ácidos graxos poli-
insaturados**

Elaborada por:
Denise Tonato

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Engenharia de Processos

Comissão Examinadora:

Marcio Antonio Mazutti, Dr. (Presidente/Orientador)

Roger Wagner, Dr. (UFSM)

Marli Camassola, Dr^a (UCS)

Santa Maria, RS, 7 de agosto de 2015.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos
Universidade Federal de Santa Maria

SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS

AUTORA: DENISE TONATO
ORIENTADOR: Dr. MARCIO ANTONIO MAZUTTI
CO-ORIENTADORA: Dra. RAQUEL CRISTINE KUHN

O objetivo deste trabalho foi selecionar micro-organismos do Bioma Pampa com potencial para a produção de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs). Foi avaliada a capacidade de produção de lipídeos de 150 cepas fúngicas, isoladas de plantas daninhas de áreas de cultivo de arroz irrigado e pastagens do Bioma Pampa. Os fungos foram cultivados em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) a 28 °C durante 7 dias. Após esse período, foram repicados sucessivamente, em meio BDA, até a obtenção de colônias isoladas. A produção de óleo microbiano foi realizada através de cultivo submersa das 150 cepas isoladas, utilizando frascos mantidos sob agitação orbital a 120 rpm, 28 °C durante 7 dias. A determinação de lipídeos foi realizada através do método de Soxhlet e o perfil de ácidos graxos através de cromatografia gasosa (GC-FID). Dentre as cepas avaliadas, sete apresentaram maior produção de lipídeos, sendo, portanto, realizada nova fermentação onde foi avaliada a influência da temperatura na produção e perfil do óleo microbiano. A fermentação foi conduzida nas mesmas condições definidas anteriormente e as temperaturas avaliadas foram 15 e 28 °C. O fungo codificado SPII65, identificado como pertencente ao gênero *Nigrospora* sp., produziu o maior teor de lipídeos tanto a 28 °C quanto a 15 °C, produzindo 11,28% e 6,02%, respectivamente. Em relação aos PUFAs a produção foi de 51,94% a 28 °C e 42,39% a 15 °C. Através dos resultados obtidos, foi delineado um planejamento experimental do tipo Plackett-Burman, onde as variáveis estudadas foram: temperatura (15-25 °C), pH (4,0-6,0), agitação (120-200 rpm), concentração da água de maceração de milho (5-15% (v/v)) e sacarose (60-180 g/L) durante 14 dias. A maior produção de PUFAs (55,75%) foi verificada nas menores temperaturas avaliadas (15 °C). Já a maior produção de lipídeos (5,54%) foi observada na temperatura de 25 °C. Foram produzidos menores teores de lipídeos utilizando meio industrial comparado aos resultados obtidos com meio sintético. Os perfis de PUFAs obtidos foram semelhantes nos meios de cultura avaliados.

Palavras-chave: Ácidos graxos poli-insaturados, ômega-3, seleção de fungos, fermentação submersa.

ABSTRACT

Master Dissertation
Process Engineering Post Graduation Program
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

FILAMENTOUS FUNGI FOR SELECTION FATTY ACID PRODUCTION POLYUNSATURATED

AUTHOR: DENISE TONATO
ADVISOR: Dr. MARCIO ANTONIO MAZUTTI
COADVISOR: Dra. RAQUEL CRISTINE KUHN

In this work, 150 fungal strains isolated in the Pampa biome were evaluated for. The microbial oil was produced by submerged fermentation in shaken flasks at 120 rpm, 28 °C for 7 days. The lipids were extracted from cells by Soxhlet (AOAC) method and the fatty acids profile determined by gas chromatography (GC-FID). Seven strains presented the best results in terms of lipids production, which were selected to evaluate the influence of temperature on microbial oil production and PUFA profiles. The fermentations were conducted under the same conditions previously defined at 15 and 28 °C. The fungus SPII65, identified as belonging to the genus *Nigrospora* sp., produced the highest level of lipids, yielding 11.28% and 6.02% with PUFAs production of 51.94% and 42.39% at 28 °C and 15 °C, respectively. From the results obtained, it was conceived a Plackett-Burmann design to investigate the main effects of temperature (15-25 °C), pH (4.0-6.0), agitation (120-200 rpm), corn steep liquor concentration (5-15% (v/v)) and sucrose (60-180 g/L). The largest production of PUFAs (55.75%) was observed in the smallest evaluated temperatures (15 °C), whereas the maximum lipid production was 5.54% at 25 °C. Lower lipid contents were produced using industrial medium compared to the results obtained with synthetic medium. PUFAs profiles were similar in the culture media evaluated.

Keywords: Polyunsaturated fatty acids, omega-3, fungi selection, submerged fermentation.

LISTA DE TABELA

TABELA 1 - Quantidade de lipídeos acumulados por diferentes espécies de micro-organismos	16
TABELA 2 - Principais ácidos graxos poli-insaturados que podem ser obtidos a partir da dieta	19
TABELA 3 - Resumo da composição dos ácidos graxos de óleo microbiano.....	20
TABELA 4- Locais de coleta, plantas daninhas infectadas e isolados fúngicos por planta, testados para produção de lipídeos.....	50
TABELA 5 - Produção de lipídeos das 150 linhagens de fungos isoladas do Bioma Pampa.	28
TABELA 6 - Produção de lipídeos em diferentes temperaturas pelas cepas selecionadas.	29
TABELA 7 - Perfil de ácidos graxos dos sete fungos selecionados e cultivados a 28 °C.	30
TABELA 8 - Perfil de ácidos graxos dos sete fungos selecionados e cultivados a 15 °C.	30
TABELA 9 - Matriz experimental do planejamento do tipo Plackett-Burman para estudar a influência de variáveis de processo no crescimento microbiano e no acúmulo de lipídeos. ...	33
TABELA 10 - Perfil dos ácidos graxos do fungo <i>Nigrospora</i> sp. obtidos nos experimentos do planejamento Plackett-Burman.....	34
TABELA 11 - Espécies mais similares a sequência da região nrDNA (ITS1-5.8S-ITS2), do isolado SPII 65, obtidas pela comparação realizada pela ferramenta <i>BLAST</i> no <i>GenBank</i>	40

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Fungo do gênero <i>Nigrospora</i> analisado microscopicamente em laboratório	22
FIGURA 2 - Cepas com maior teor de lipídeos das 150 isoladas no Bioma Pampa	27
FIGURA 3 - Gráfico de pareto expressando os efeitos das variáveis independentes na concentração de biomassa	35
FIGURA 4 - Gráfico de pareto expressando os efeitos das variáveis independentes no teor de lipídeos total	36
FIGURA 5 - Gráfico de pareto expressando os efeitos das variáveis independentes no teor de SFA (ácido graxo saturado).....	37
FIGURA 6 - Gráfico de pareto expressando os efeitos das variáveis independentes no teor de MUFA(ácido graxo monoinsaturado).....	38
FIGURA 7 – Gráfico de pareto expressando os efeitos das variáveis independentes no teor de PUFA (ácido graxo poli-insaturado).....	39

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

PUFA	ácido graxo poli-insaturado
MUFA	ácido graxo monoinsaturado
SFA	ácido graxo saturado
AMM	água de maceração de milho
ALA	ácido alfa-linolênico
EPA	ácido eicosapentaenóico
DHA	ácido docosaheptaenóico
DNA	ácido desoxirribonucleico
FAME	ésteres metílicos de ácidos graxos
C/N	carbono/nitrogênio
n-3	ômega-3
n-6	ômega-6
α	alfa
γ	gama
Σ	somatório
°C	graus Celsius
g/L	gramas por litro
p/p	masa/massa
v/v	volume por volume
rpm	rotações por minuto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2.OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3.1 Lipídeos	13
3.2 Fungos produtores de lipídeos	13
3.3 Extração de lipídeos	17
3.4 Composição dos ácidos graxos presentes em micro-organismos oleaginosas	18
3.5 Fungo do gênero <i>Nigrospora</i> sp	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Prospecção dos micro-organismos.....	23
4.2 Isolamento dos micro-organismos	23
4.3 <i>Screening</i>	23
4.4 Influência de condições de cultivo na produção de óleo microbiano pela cepa selecionada	24
4.5 Identificação do micro-organismo	24
4.6 Análise dos ácidos graxos	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1 <i>Screening</i> dos fungos	27
5.2 Efeito da temperatura na produção de ácidos graxos.....	29
5.3 Avaliação dos efeitos de variáveis de processo no cultivo do fungo <i>Nigrospora</i> sp. e produção de óleo microbiano.....	32
5.4 Identificação Molecular do micro-organismo.....	39
6. CONCLUSÃO	41
CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
REFERÊNCIAS.....	44
ANEXO.....	49

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos anos diversas pesquisas científicas vêm destacando a importância dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS) para a saúde humana. Alguns ácidos graxos poli-insaturados são considerados essenciais, pois não são produzidos pelo organismo, necessitando ser ingeridos através dos alimentos.

Os ácidos graxos são constituintes das células, exercem funções estruturais, energética, sinalizadora, entre outras. Os PUFAs abrangem as famílias n-6 e n-3 (ômega-6 e ômega-3), tais como ácido linoleico e α -linolênico, os quais são considerados essenciais (CLEMENTE, 2007). Ácidos graxos que possuem mais de 16 átomos de carbono são denominados de cadeia longa. Já aqueles com cadeia carbônica maior que 20 átomos, são denominados ácidos graxos de cadeia muito longa.

Os ácidos graxos poli-insaturados, ômega-3, apresentam efeito na proteção contra várias doenças, dentre elas cardiovasculares, psiquiátricas, neurológicas, dermatológicas e reumatológicas (ASSY, 2009). O ácido α -linolênico (ALA), que pertence e dá origem ao ômega-3, permite a formação de dois importantes ácidos graxos de cadeia longa: o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosaenoico (DHA). Pesquisas mostram que esses ácidos graxos são capazes de ajudar no combate de doenças cardiovasculares, conter reações inflamatórias e são fundamentais para o desenvolvimento do sistema nervoso (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2002).

Atualmente, as principais fontes de ácidos graxos ômega-3 são através do óleo de peixe de águas profundas e frias, e em menor quantidade também pode ser encontrados em oleaginosas e óleo de linhaça, ovos enriquecidos e leite fortificado (ETHIER, 2010).

No 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 a pesca exploratória. Além disso, a produção dos ácidos graxos essenciais n-3, a partir de óleos de peixe apresenta alguns inconvenientes, como odor não atrativo, contaminação, instabilidade e custo elevado de purificação (WEN; CHEN, 2001).

O ácido graxo essencial linoleico é representante da família ômega-6, o qual é facilmente encontrado em óleos vegetais, especialmente nos de milho, algodão, soja, gergelim, girassol e canola. O ácido linoleico é convertido no organismo em outro ácido graxo desta família, denominado ácido γ -linoleico, sendo, posteriormente, transformado no

organismo em ácido araquidônico. Nas doenças cardiovasculares a participação dos ácidos graxos ômega-6, em perfeito equilíbrio com o ômega-3, é de fundamental importância, uma vez que o ômega-6 auxilia na diminuição dos níveis de colesterol total e do chamado “colesterol ruim” (LDL), contribuindo para a redução das mortes por doenças cardíacas (REGITANO-D'ARCE, 2006).

Os ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) também apresentam um efeito benéfico juntamente com os PUFAs na redução do risco de doenças cardiovasculares. Uma dieta rica em MUFAs, com o ácido oleico (ômega-9), conduz a uma redução da glicose e da pressão arterial e aumenta os níveis do colesterol HDL (FORNAZZARI et al., 2007).

Pesquisas relativas à produção de ácidos graxos poli-insaturados utilizando fungos por fermentação submersa têm crescido nos últimos anos. Entretanto, ênfase tem sido dada para o *screening* de cepas mais eficientes, utilizando substratos sustentáveis com o cultivo em condições ótimas para a promoção do máximo rendimento em ácidos graxos poli-insaturados (JANG et al., 2005). Portanto, a produção de PUFAs, principalmente com altas concentrações de n-3 e n-6, é um grande desafio e a busca por micro-organismos oleaginosos, como alternativas para a produção de óleo têm crescido consideravelmente (ARJUNA, 2014).

Vários fungos, especialmente cepas pertencente ao gênero *Mortierella*, são conhecidos na literatura por produzir elevada quantidade de ácidos graxos poli-insaturados. No entanto, o principal desafio na produção dos ácidos graxos poli-insaturados é a seleção de uma cepa que produza grande quantidade de biomassa e apresente alto rendimento de ácidos graxos n-3 e n-6 (LI et al., 2008). Embora se tenha conhecimento dos principais micro-organismos produtores de ácidos graxos poli-insaturados, há um grande interesse no uso da biodiversidade brasileira para o isolamento de micro-organismos potenciais para este processo. Como se sabe, o Brasil apresenta uma grande biodiversidade ainda pouco explorada em termos da avaliação/seleção de micro-organismos para serem usados em processos biotecnológicos. Entre os Biomas de grande interesse para o Estado do Rio Grande do Sul tem-se o Bioma Pampa, o qual constitui importante biodiversidade para o estado, tratando-se de um patrimônio natural, genético e cultural de importância nacional e global.

Nesse sentido, a seleção de micro-organismos a partir do bioma Pampa para a produção de ácidos graxos poli-insaturados é uma alternativa para o desenvolvimento econômico e sustentável do país a partir de processo biotecnológico com o micro-organismo selecionado.

Em vista do que foi exposto, o presente trabalho teve como objetivo principal selecionar cepas de fungos isolados no bioma Pampa com capacidade para a produção de PUFAs, através de fermentação submersa.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Selecionar fungos produtores de lipídeos no Bioma Pampa, visando a produção de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) através de processo fermentativo.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar e selecionar fungos produtores de ácidos graxos poli-insaturados no bioma Pampa.
- Avaliar a influência da temperatura na produção de lipídeos e perfil dos ácidos graxos.
- Identificar taxonomicamente, através de biologia molecular, o fungo selecionado para produção de ácidos graxos.
- Avaliar o processo fermentativo em escala de bancada, através do estudo da influência da composição do meio, agitação, temperatura e pH na produção de ácidos graxos poli-insaturados.

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 Lipídeos

Os lipídeos são compostos orgânicos altamente energéticos, conhecidos também como gorduras, apresentam em sua composição ácidos graxos essenciais ao funcionamento do organismo e também atuam no transporte de vitaminas lipossolúveis. São compostos não solúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos, tais como: hexano, benzeno, clorofórmio, metanol, éter, acetona (SANTOS; XAVIE; MOREIRA, 2012).

A classificação dos lipídeos depende da sua composição, quando estes são formados por carbono, hidrogênio e oxigênio, são classificados como lipídeos simples, e são divididos em dois grupos. O grupo composto pelos triglicérides ou glicerídeos, formados quando o álcool é o glicerol e o grupo composto por ceras ou cerídeos, formados quando o álcool tem um massa eminente. Já os lipídeos complexos, além de apresentarem na sua estrutura a composição encontrada nos lipídeos simples, como carbono, hidrogênio e oxigênio, englobam em sua estrutura o nitrogênio, fósforo, entre outros. São encontrados dois tipos de lipídeos complexos, os fosfolipídeos, que completam as membranas celulares e os esteroides, que são lipídeos formados pelo colesterol (SANTOS; XAVIE; MOREIRA, 2012).

As funções dos lipídeos são complexas e diversas, algumas cruciais para o bom funcionamento do organismo, entre estas funções estão: cofatores enzimáticos, transportadores de elétrons, âncoras hidrofóbicas, agentes emulsificantes, hormônios e mensageiros intracelulares (OYAMA et al., 2001). Os lipídeos são constituintes importantes de células e tecido humano e tem várias funções importantes no metabolismo relacionadas com o crescimento e manutenção do corpo (ARJUNA, 2014).

3.2 Fungos produtores de lipídeos

Os fungos são organismos eucarióticos, uni ou pluricelulares, heterótrofos e podem se reproduzir de forma sexuada ou assexuadamente (MALAJOVICH, 2012). São predominantemente aeróbios, com temperatura ótima de crescimento entre 25 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,

vêm despertando um grande interesse para o uso biotecnológico (MEYER, 2008). São utilizados em muitos processos industriais como na produção de enzimas, vitaminas, polissacarídeos, pigmentos, lipídeos e glicolipídeos.

Micro-organismos oleaginosos são as espécies oleaginosas com conteúdo de óleo 20% em relação à biomassa (MENG et al., 2009). As algas, leveduras e fungos filamentosos são conhecidos devido a sua capacidade de acúmulo de lipídeos (CARVALHO, 1994).

O armazenamento de lipídeos depende, primeiramente, da sua fisiologia, condições ambientais e a quantidade de nutrientes, além da temperatura e pH (BEOPOULOS et al., 2009). Os organismos iniciam o acúmulo de lipídeos sob condições limitantes de nitrogênio e na presença de uma fonte de carbono em excesso, assim uma alta razão de C/N (carbono/nitrogênio), próxima de 100, é um requisito básico para o acúmulo de lipídeos (MULDER et al., 1962).

O óleo produzido por fungos oleaginosos têm sido extensivamente estudado para a produção de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) devido ao número elevado de insaturações em relação aos lipídeos acumulados pelas leveduras (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011). Entretanto, as leveduras têm enorme importância devido a um elevado acúmulo de lipídeos (BEOPOULOS et al., 2009). Pertencente a este grupo, os micro-organismos mais conhecidas são do gênero *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Rhizopus*, *Thichosporon* e *Yarrowia*.

As espécies de fungos, como *Aspergillus terreus*, *Claviceps purpurea*, *Tolyposporium*, *Mortierella alpina*, *Mortierella isabelina* também apresentam a característica de acumular lipídeos. A maioria desses fungos produz ácidos graxos da família ômega-3 como o DHA, EPA e da família ômega-6 como o ácido araquidônico (LI; DU; LIU, 2008).

Os lipídeos produzidos por micro-organismos 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, fase de crescimento, condições ambientais e substratos do meio de cultivo (SILVA, 2011).

Variedades de sacarídeos e culturas energéticas têm sido investigadas como substratos no cultivo de micro-organismos oleaginosos para o acúmulo de lipídeos. Exemplos relatados recentemente encontram-se resumidos na Tabela 1. Alguns micro-organismos oleaginosos

têm demonstrado serem capazes de utilizar diferentes fontes de carbono como glicose, frutose, xilose, sacarose e amido para acúmulo de lipídeos.

É possível observar, por meio da Tabela 1, 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 nessa ordem de 82,7 e 80%. Também pode-se verificar que 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 interior do micro-organismo, que nesse caso variou de 64,1-65,9%. Deve-se levar em consideração que os valores dos resultados do teor de lipídeos foram calculados em relação biomassa seca e o meio de cultivo das diferentes espécies de fungos foi diferenciados, sendo eles, fornada, *fedbatch*, cultura submersa com luz e fermentação em estado semi-sólido.

Tabela 1- Quantidade de lipídeos acumulados por diferentes espécies de micro-organismos

Espécies	Fonte de carbono	Lipídeo (% biomassa seca)	Fonte
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Glicose	82,7	Zhang et al. (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>Epicoccum eurpurascens</i>	Sacarose	80,0	. Koutb e Morsy (2011)
<i>Candida curvata</i>	Xilose	48,6	Evans e Ratledge (1983)
<i>Chlorella protothecoides</i>	Amido de mandioca	26,5	. Wei (2009)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Fécula de batata	40,0	Wild (2010)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Amido de mandioca	47,9	Zhao et al. (2010)
<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>Metschnikowia pulcherrima</i>	lignocelulose	40,0	Santamauro et al. (2014)
<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>	Glicerina	52,0	Liang et al. (2010)
<i>Torulaspora globosa</i> YU5 / 2	Glicose	45,7	Leesing e Baojungharn (2011)
<i>Rhodotorula Glacialis</i> DBVPG 4785	Glicose	68,0	Amaretti et al. (2010)
<i>Mortierella isabellina</i>	Soro de leite coalhado	21,3	Demir et al. (2013)
<i>Aspergillus terreus</i>	Bagaço de cana- de-açúcar	19,0	Kamat et al. (2013)
<i>T. spathulata</i> e <i>K. ohmeri</i>	Glicerol bruto	53,3	Kitcha e Cheirsilp (2011)
<i>Aspergillus terreus</i> IBB M1	Glicose	54,0	Khot et al. (2012)
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	Resíduos da produção de biodiesel (glicerol Industrial)	41,0	Kiran et al. (2013)

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

3.3 Extração de lipídeos

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 da propriedade final da fração lipídica (BRUM; ARRUDA; REGITANO-D'ARCE, 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 de 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).

Metodologias aplicando procedimentos quentes e frios são amplamente utilizadas para a extração de óleo. Dentre os métodos de extração de lipídeos totais encontrados na literatura, destaca-se o método de Soxhlet (1879), que envolve o uso de um extrator, em que o solvente quente (próximo da sua temperatura de ebulição) passa pelo interior da amostra durante um tempo prolongado, em geral entre 5 a 8 horas. Apesar de ser um método muito utilizado, este período prolongado de refluxo do solvente, pode conduzir à degradação de compostos termossensíveis, devido ao seu longo período de exposição ao calor. Um dos processos de extração lipídica mais eficaz, que supera os obstáculos mencionados no método citado anteriormente, é a metodologia de Bligh e Dyer (1959). Esta metodologia consiste numa

extração a frio com um mistura de clorofórmio-metanol, e não requer qualquer equipamento especial, e a análise é mais rápida. No entanto, solventes voláteis e tóxicos são utilizados neste método (DIAS et al., 2013).

Alguns métodos alternativos de extração de lipídeos vêm sendo desenvolvidos, os quais são baseados em misturas que contém alcão-álcool-água, tais como: hexano-isopropanol-água. Essas misturas têm sido propostas como um sistema de solventes menos tóxicos, de menor custo de 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, extração em fase sólida, extração com fluido supercrítico e extração assistida por micro-ondas. Apesar de esses 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).

3.4 Composição dos ácidos graxos presentes em micro-organismos oleaginosos

Os ácidos graxos são constituídos de uma cadeia carbônica apolar e um grupo carboxila polar, sendo representados pela fórmula geral RCOOH . Esse composto pode não apresentar ramificação e possuir entre 4 a 36 átomos de carbono. Os compostos que apresentam entre 16 e 18 átomos de carbonos em sua estrutura são mais frequentemente encontrados. Esses ácidos podem ser encontrados na natureza na forma saturada, apenas ligações simples e cadeias planas, ou também podem ser encontrados na forma insaturada, constituídas por uma ou mais ligações duplas (SILVA, 2011).

Os PUFAs (ácidos graxos poli-insaturados) contêm na sua estrutura um número entre 18 a 22 carbonos e são compostos pelas famílias ômega-3 e ômega-6. Os ácidos graxos da família ômega-3 são designados desta forma, pois apresentam a primeira dupla ligação entre o terceiro e o quarto átomo de carbono, enquanto os ácidos graxos da família ômega-6 contêm a primeira dupla ligação entre o sexto e o sétimo átomo de carbono (MAHECHA et al., 2002).

A localização e o número das duplas ligações vão determinar as propriedades físicas e químicas dos PUFAs. As famílias de n-3 e n-6 atuam em conjunto para regular os processos biológicos e possuem diferentes funções fisiológicas

Os ácidos graxos essenciais, linoleico, (n-6), α -linolênico, (n-3), não são produzidos pelo organismo humano, pois na célula dos mamíferos não há dessaturase que atue além da posição do carbono-9. Desta forma devem ser obtidos a partir da ingestão de alimentos ricos nestes ácidos graxos (MAHECHA et al., 2002). Um resumo dos principais ácidos graxos poli-insaturados da família n-3 e n-6 que podem ser obtidos a partir da dieta, pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Principais ácidos graxos poli-insaturados que podem ser obtidos a partir da dieta.

Ácido	Abreviatura
Família n-3	
9, 12, 15- Octadecatrienoico (linolênico)	C18:3 n-3
5, 8, 11, 14, 17-Eicosapentanoico (EPA)	C20:5 n-3
4, 7, 10, 13, 16, 19-Docosaexanóico (DHA)	C22:6 n-3
Família n-6	
9, 12-Octadecadienoico (linoleico)	C18:2 n-6
5, 8, 11, 14-Eicosatetraenoico (araquidônico)	C20:4 n-6

Fonte: RASERA, 2012.

Os lipídeos produzidos por micro-organismos apresentam em sua composição principalmente os ácidos graxos: palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoléico (C18:2), α -linolênico (C18:3), que é semelhante a composição encontrada em óleos vegetais (JINGYANG, et al., 2012).

Um resumo da composição dos ácidos graxos de óleo microbiano obtido a partir de vários micro-organismos oleaginosos, utilizando diferentes fontes de carbono é fornecido na Tabela 3. Os ácidos graxos encontrados em maior quantidade são o palmítico (C16: 0), esteárico (C18: 0), oleico (C18: 1), linoleico (C18: 2) e linolênico (C18: 3). Nesta tabela também pode se perceber que o perfil de ácidos graxos depende de cada espécie. Por exemplo, apesar de utilizar a mesma fonte de carbono, glicose, a *Chlorella protothecoides* apresenta em seu perfil de ácidos graxos um maior teor de ácido linoleico em comparação com leveduras e fungos oleaginosos, e *Elegans thamnidium* contém um alto teor de ácido oleico, enquanto a *Rhotorula glutinis* é relativamente rica em ácido esteárico.

Tabela 3- Resumo da 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 ₂	0,2	25,1	2,3	0,9	19,0	41,5	0,8
<i>Chlorella vulgaris</i>	CO ₂	N/D	26,1	1,3	24,8	47,8	N/D	N/D
<i>Chlorella zofingiensis</i>	CO ₂	N/D	28,8	3,7	17,9	20,8	12,2	N/D
	Glicose	N/D	23,9	1,2	35,2	20,2	8,3	N/D
<i>Chlorella protothecoides</i>	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.

O óleo acumulado pelos fungos oleaginosos é mais insaturado do que o óleo produzido por leveduras. Esta é a principal razão pela qual os fungos oleaginosos são principalmente utilizados, a fim de produzir lipídeos ricos em ácidos graxos poli-insaturados de interesse médico e dietético como o ácido linolênico, ácido araquidônico, ácido docosaenoico, ácido eicosapentanoico, etc, (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011).

Ácidos graxos, tais como o ácido araquidônico, ácido docosaenoico, ácido γ -linolênico e ácido eicosapentanoico, são de grande importância devido aos seus efeitos benéficos sobre o desenvolvimento do cérebro infantil, função do sistema cardiovascular, entre outros (MARTINEZ et al., 2015).

3.5 Fungo do gênero *Nigrospora*.

Nigrospora é um fungo dematiáceo filamentosos, largamente disseminado no ambiente como solo, plantas e sementes, apresentando-se como um contaminante comum. Cresce rapidamente na forma de colônias com textura lanosa, e num período de três a quatro dias recobre totalmente uma placa de meio BDA (batata, dextrose, ágar), numa temperatura de 25 °C. As colônias apresentam-se inicialmente com micélio branco que ao passar do tempo torna-se cinza com áreas negras. Na cultura, a cor da colônia escurece em proporção com o aumento da quantidade de esporulação durante a incubação. Algumas espécies deste fungo podem levar mais de três semanas para esporular (KANIA, 2014).

O *Nigrospora* é um frequente patógeno de plantas, afetando grãos e frutas. São muito comuns em sementes de um grande número de hospedeiros, sendo frequentemente encontrado em sementes de soja (GOULART, 2004). Analisado microscopicamente em laboratório, *Nigrospora*, apresenta hifas septadas e hialinas, conidióforos também hialinos, ou levemente pigmentados. As células conidiogênicas nos conidióforos são infladas e com formato de ampola. Essas células apresentam um único conídio de 14-20 micra de diâmetro em seu ápice. Os conídios são pretos, unicelulares, levemente achatados (KANIA, 2014).

Como o próprio nome indica, o gênero *Nigrospora*, ou "esporos preto" em latim, é muito fácil de ser identificado através do microscópio, por ser unicelular, preto, brilhante, esporos assexuais (conídios) achatados e muitas vezes com uma linha equatorial incolor (Figura 1). Os fungos deste gênero, são encontrados principalmente em países tropicais e subtropicais e em regiões temperadas (DELGADO; SANTO-PIETRO, 2006).



Figura 1- Fungo do gênero *Nigrospora* analisado microscopicamente em laboratório.

Fonte: DELGADO; SANTO-PIETRO, 2006.

Com relação à produção de lipídeos, há um relato de fungos desse gênero. Peng e Chen (2007), realizaram uma triagem de cepas para a produção óleo microbiano com 141 fungos endofíticos, isolados a partir de caules de plantas oleaginosas. Estes autores observaram que vinte e seis isolados apresentaram maior acúmulo de lipídeos, cujos microorganismos pertenciam a cinco gêneros, incluindo: *Microsphaeropsis*, *Phomopsis*, *Cephalosporium*, *Sclerocystis* e *Nigrospora*. Estes fungos foram cultivados em estado sólido utilizando palha e farelo de trigo como substrato, apresentaram um rendimento de óleo variando de 21,3-35,0% (p/p).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta dos micro-organismos

Foram coletadas plantas daninhas infectadas por fungos em áreas de cultivo de arroz e pastagem do Bioma Pampa. Estas coletas foram realizadas em diferentes locais e épocas do ano, a fim de obter uma maior diversidade de plantas. As amostras de plantas coletadas foram armazenadas em sacos plásticos individuais e acondicionadas sob refrigeração usando gelo em caixas de isopor durante o transporte para o laboratório, onde foi realizado o isolamento e identificação das plantas coletadas. Estas coletas ocorreram no período de 2012 a 2014. As espécies coletadas e os locais de coleta podem ser visualizados na Tabela 4 (ANEXO A).

4.2 Isolamento dos micro-organismos

O isolamento dos fungos foi realizado em placas de Petri estéreis contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), incubadas a 28 °C durante 7 dias no escuro (LORENZI, 2006). Após o crescimento, os fungos foram repicados sucessivamente em placas de Petri, em BDA, até a obtenção de colônias isoladas puras.

4.3 *Screening*

Foram isoladas 150 cepas, as quais foram crescidas para avaliar a produção de lipídeos. As fermentações foram realizadas a partir da transferência de 1 disco (6 mm) do micélio fúngico mantido em placa de Petri com meio BDA (ALFENAS; MAFIA, 2007) para Erlenmeyers contendo 50 mL de meio de cultura, composto por: 10 g/L de glicose, 7,5 g/L de extrato de levedura; 10 g/L de peptona; 2 g/L de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1 g/L de sulfato ferroso $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$; 1 g/L de sulfato de manganês $(\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})$ e 0,5 g/L de sulfato de magnésio $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ (YU et al., 1998; SELBMANN et al., 2002; PARRA et al. 2005 e ZHANG et al., 2012) e pH a 5,8. A fermentação foi conduzida em agitador orbital a 120 rpm a 28 °C durante 7 dias.

Após a fermentação, a biomassa fúngica foi separada por centrifugação a 2500 rpm durante 5 minutos. O material celular foi lavado com água destilada e seco em estufa a 50 °C, durante 48 horas e por fim submetido à extração de lipídeos. Nesta primeira etapa, os lipídeos foram extraídos por soxhlet e o resultado expresso em percentual de óleo microbiano por kg de biomassa.

A partir dos resultados obtidos na etapa de *screening*, foram selecionadas as cepas com maior produção de lipídeos para investigação do efeito da temperatura de cultivo (15 e 28 °C) na produção de óleo microbiano e no perfil de ácidos graxos. A cepa que apresentou maior produção de lipídeos e perfil de ácidos graxos composto de PUFAs foi identificada e usada nas demais etapas do trabalho.

4.4 Influência de condições de cultivo na produção de óleo microbiano pela cepa selecionada

Nesta etapa do trabalho, buscou-se substituir o extrato de levedura e a peptona, devido o seu alto custo para utilização em processos industriais, por água de maceração de milho, a qual é um subproduto da indústria de processamento de milho para a produção de xarope de frutose e apresenta baixo custo (RIVAS et al., 2004). Esse substrato mostrou resultados satisfatórios no crescimento de micro-organismos por ser uma potencial fonte de nitrogênio (HOCH, 1997). Além de beneficiar o meio de crescimento por ser uma fonte de nitrogênio, este substrato fornece a maioria dos micronutrientes, vitaminas e fatores estimulantes do crescimento do micro-organismo e produção de metabólitos (KUMAR; TAKAGI, 199).

A partir da seleção da cepa promissora para a produção de PUFA, foi delineado um planejamento do tipo Plackett–Burmann para avaliar o efeito da temperatura (15-25 °C), pH (4-6), agitação (120-200 rpm), concentração de água de maceração de milho (AMM) (5-15%, v/v) e concentração de sacarose (60-180 g/L) no teor de óleo microbiano e no perfil de perfil de ácidos graxos.

4.5 Identificação do micro-organismo

O micro-organismo selecionado foi identificado por técnicas de biologia molecular. A extração do DNA foi realizada a partir de alíquotas do *pellet* do crescimento em meio de cultura líquido Batata Dextrose (BD) usando o Kit de extração ZR Fungal/Bacterial DNA

Mini Prep (Zymo Research). Após a extração do DNA a completa região do nrDNA (ITS1-5.8S-ITS2) para fungos foi amplificada com os primers ITS1 e ITS4 (WHITE, 199). A reação de amplificação dos fragmentos alvo foi realizada conforme Baldoni et al. (2012). Os fragmentos amplificados de DNA foram corados com BlueGreen Loading Dye I[®] (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil), visualizados em gel de agarose (1%) e observados em luz ultravioleta. Após, os produtos da PCR foram purificados com o *kit Gen Elute PCR clean-up Kit*[®] (Sigma, Saint Louis, EUA). O sequenciamento das amostras foi realizado no sequenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os fragmentos sequenciados foram analisados utilizando o programa Staden Package 2.0.0b (STADEN et al., 2003) para a obtenção das sequências consenso. Após essa etapa as sequências consenso, foram depositadas no *GenBank*.

A sequência consenso do isolado foi comparada com as demais sequências depositadas no *GenBank of the National Center for Biotechnology Information* (NCBI) por meio da ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). Como resultado da comparação, as sequências que apresentaram maiores escores de similaridade e cobertura com a sequência consenso, foram escolhidas para o alinhamento. O alinhamento das sequências foi realizado no programa BioEdit 7.2.5 (HALL,1999), utilizando o algoritmo ClustalW. Foi considerada do mesmo gênero a sequência que apresentou similaridade maior que 95% com a sequência do isolado.

4.6 Análise dos ácidos graxos

Para a determinação do perfil de ácidos graxos produzidos, os acilgliceróis foram extraídos da biomassa seca empregando o método descrito por Bligh e Dyer (1959) e a derivatização foi realizada segundo o método descrito por Hartman e Lago (1973). As análises foram realizadas em cromatógrafo gasoso equipado com detector de ionização em chama (GC-FID), marca Varian modelo Star3400CX (CA, EUA) e amostrador automático Varian, modelo 8200 (CA, EUA). Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) foram separados em coluna capilar SPTM-2560 (SUPELCO, Bellefonte, EUA) (100 m × 0,25 mm × 0,20 μm). O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio à pressão constante de 25 psi. O injetor manteve-se no modo *split* com razão 50:1 e temperatura de 250 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 120 °C, durante 1 min, aumentando para 240 °C com taxa de 3 °C/min,

mantendo-se em isoterma por 15 min. O detector manteve-se na temperatura de 240 °C. A identificação dos FAME foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos analitos com padrões 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 *Screening* dos fungos

A Figura 2 apresenta as cepas com maior produção de lipídeos das 150 linhagens de fungos isoladas do Bioma Pampa.

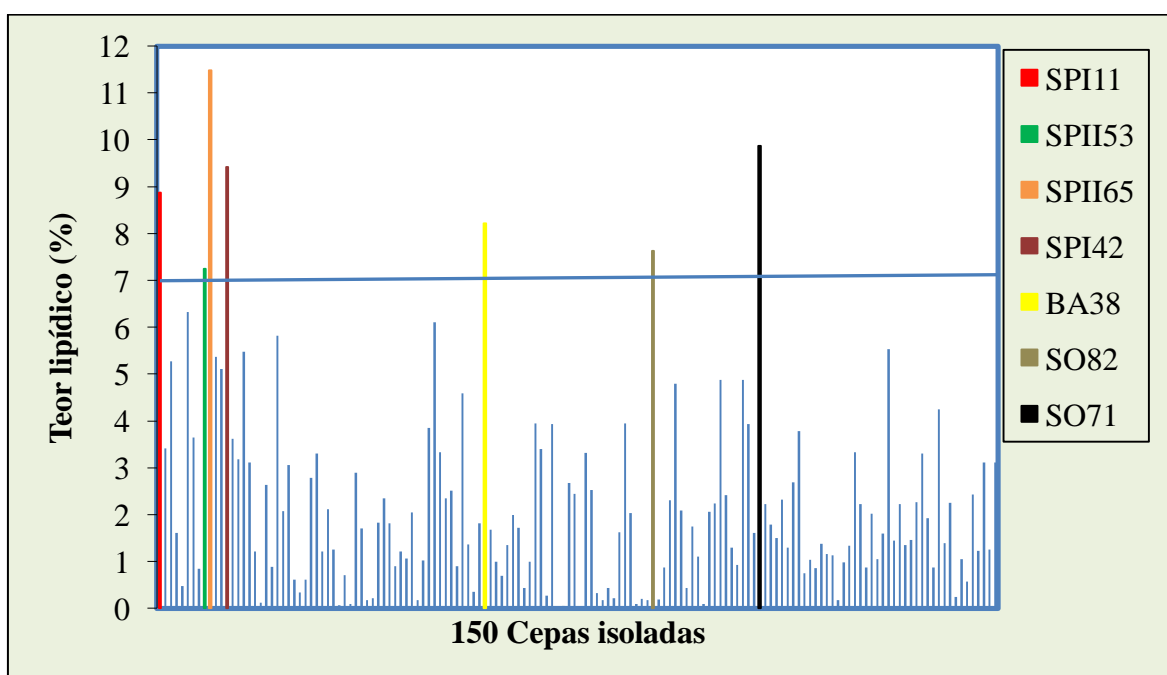


Figura 2 – Cepas com maior teor de lipídeos das 150 isoladas no Bioma Pampa.

Dos resultados apresentados na Figura 2, sete cepas apresentaram um teor de lipídeos superior a 7%, sendo elas: SPII65 (11,48%), SO71 (9,87%), SPI42 (9,42%), SPI11 (8,87%), BA38 (8,21%), SO82 (7,63%), SPII53 (7,25%). A quantidade de lipídeos encontrado nessas cepas foi relevante, comparando com resultados encontrados na literatura, sendo reportados micro-organismos com produção de até 20% de lipídeos (PAPANIKOLAU; AGGELIS, 2011).

A Tabela 5 apresenta o teor de lipídeos das 150 cepas isoladas no Bioma Pampa. As cepas que apresentaram maior produção de lipídeos foram selecionadas para avaliar qual o efeito da temperatura na produção e perfil dos ácidos graxos.

Tabela 5 - Produção de lipídeos das 150 linhagens de fungos isoladas do Bioma Pampa.

Código	% lipídeos	Código	% lipídeos	Código	% lipídeos	Código	% lipídeos	Código	% lipídeos	Código	% lipídeos
SPI11	8,87	SPII42	0,34	BA314	3,33	SO84	0,03	BA21	4,88	SO211	2,22
SPI43	3,41	SPII13	0,62	BA12	2,35	SO18	3,32	VP75	2,42	SO75	0,87
SPII51	5,27	SPII33	2,79	VP86	2,51	SO52	2,52	VP55	1,30	VP82	2,02
SPII72	1,61	SPII11	3,30	SO27	0,90	SO29	0,33	BA35	0,93	SO12	1,05
SPII63	0,48	SPII35	1,21	BA53	4,59	BA36	0,18	SO81	4,88	SO210	1,60
SPI41	6,32	SPII38	2,11	BA66	1,36	VP47	0,44	VP61	3,93	SO111	5,53
SPII37	3,65	SPII57	1,25	BA15	0,35	RS23	0,22	SO11	1,61	SO42	1,45
SPI45	0,85	SPII56	0,07	BA11	1,82	VP77	1,63	SO71	9,87	SO74	2,22
SPII53	7,25	SPII61	0,71	BA38	8,21	SO32	3,95	VP85	2,23	BJ11	1,35
SPII65	11,48	SPII55	0,10	OR22	1,68	SO94	2,03	BR31	1,79	SO113	1,46
SPII54	5,37	BA39	2,90	BA313	0,99	SO105	0,10	SO210	1,50	VP12	2,26
SPII64	5,11	VP88	1,71	BA55	0,69	SO21	0,20	BA23	2,32	BA61	3,31
SPI42	9,42	BA13	0,17	SO13	1,35	RS27	0,17	SO104	1,30	BA63	1,92
SPII4	3,62	BA311	0,22	SO131	1,99	SO82	7,63	VP61	2,69	VP67	0,87
SPII36	3,18	VP22	1,83	BA312	1,72	SO102	0,19	SO41	3,79	VP84	4,25
SPII43	5,48	BA57	2,35	BA67	0,43	SO62	0,88	BA31	0,75	BA34	1,39
SPII23	3,11	BA64	1,81	SO116	1,00	SO28	2,31	VP65	1,04	SO25	2,25
SPII62	1,22	OR12	0,90	BA51	3,95	SO112	4,79	BA58	0,86	SO115	0,25
SPII32	0,12	BA41	1,21	VP64	3,40	SO134	2,09	SO91	1,38	SO132	1,05
SPII22	2,63	BA14	1,07	SO34	0,27	SO114	0,43	SO122	1,16	BA54	0,57
SPII36	0,89	VP85	2,05	SO13	3,93	BA62	1,75	SO74	1,13	SO73	2,43
SPII14	5,82	OR11	0,17	OR15	0,02	OR21	1,10	SO72	0,18	RS21	1,23
SPII24	2,07	BA65	1,02	SO31	0,05	SO72	0,09	BA52	0,98	RS24	3,12
SPII34	3,06	BA64	3,85	SO54	2,67	VP82	2,06	SO15	1,34	DF21	1,25
SPII31	0,62	OR13	6,11	BA37	2,45	DF22	2,24	DP14	3,33	DP13	3,12

5.2 Efeito da temperatura na produção de ácidos graxos

A Tabela 6 apresenta os resultados das sete cepas selecionadas como maiores produtoras de lipídeos cultivadas a 15 e 28 °C.

Tabela 6 - Produção de lipídeos em diferentes temperaturas pelas cepas selecionadas.

Cepas	Lipídeos Totais (% , p/p) (28 °C)	Lipídeos Totais (% , p/p) (15 °C)
SPI11	8,17	3,83
BA38	8,10	4,44
SO82	6,98	1,70
SPI42	8,40	3,57
SO71	9,55	0,00
SPII65	11,28	6,02
SPII53	6,84	3,21

O teor de lipídeos diminuiu significativamente com a redução na temperatura de cultivo. Na temperatura de 28 °C os teores de lipídeos variaram de 6,84 a 11,28% e a 15 °C essa variação foi de 1,7 a 6,2%. A cepa que apresentou maior acúmulo de lipídeos tanto a 28 °C quanto a 15 °C foi a cepa codificada como SPII65 com 11,28% e 6,02%, respectivamente. É importante ressaltar que os resultados apresentados na Tabela 6 para a temperatura de 28 °C são similares aos apresentados na Tabela 5 para os mesmos micro-organismos nas mesmas condições, mostrando haver reprodutibilidade nos resultados. As Tabelas 7 e 8 apresentam os perfis de ácidos graxos das sete cepas avaliadas a 28 °C e 15 °C, respectivamente.

Tabela 7 - Perfil de ácidos graxos dos sete fungos selecionados e cultivados a 28 °C.

Código	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1n9t	C18:1n9c	C18:2n6c	C18:3n6	C20:1n9	C18:3n3	C20:2 cis-11,14	C20:4n6	C20:3n3 cis-11,14,17	C24:1n9	ΣSFA	ΣMUFA	ΣPUFA
SP111	0,31	0,27	20,72	2,91	0,16	9,56	-	24,84	37,11	-	-	1,06	0,16	0,13	-	0,28	31,02	28,03	38,46
BA38	0,30	0,30	20,02	2,74	0,23	8,35	-	21,57	42,05	-	-	1,11	-	0,18	-	0,48	29,02	24,79	43,34
SO82	0,60	0,11	28,52	0,35	0,14	12,98	0,18	34,76	18,34	-	0,12	1,39	0,12	0,08	-	-	42,35	35,41	19,93
SPI42	0,42	0,23	23,31	1,24	0,32	8,45	0,14	28,09	32,29	-	0,17	3,12	0,14	-	-	-	32,73	29,64	35,55
SO71	0,41	0,34	22,09	0,89	0,39	6,68	-	12,3	52,36	-	-	3,16	0,29	-	-	-	29,91	13,19	55,81
SP1165	0,22	0,22	20,98	1,17	0,32	4,25	-	19,24	43,68	0,15	0,23	7,7	0,23	-	0,18	-	25,99	20,64	51,94
SP1153	0,38	0,21	22,11	1,24	8,35	0,38	-	29,37	32,06	-	0,26	2,82	0,25	0,17	-	0,24	31,43	31,11	35,3

Código - (nomenclatura dos fungos); C14:0 - (Ácido Mirístico); C15:0 - (Ácido Pentadecanóico); C16:0 - (Ácido Palmítico); C16:1 - (Ácido Palmitoléico); C17:0 - (Ácido Heptadecanóico); C18:0 - (Ácido Esteárico); C18:1n9t - (Ácido Eláidico); C18:1n9c - (Ácido Oléico); C18:2n6c - (Ácido Linoléico); C18:3n6 - (Ácido γ -linolênico); C20:1n9 - (Ácido cis-11-Eicosenóico); C18:3n3 - (Ácido α -linolênico, ALA); C20:2 cis-11,14 - (Eicosadienóico); C20:4n6 - (Ácido araquidônico); C20:3n3 cis-11,14,17-(eicosatrienóico, ETE); C24:1n9 - (Ácido Nervônico); ΣSFA - (Somatória do ácidos graxos saturados); ΣMUFA - (Somatória dos ácidos graxos monoinsaturados); ΣPUFA (Somatória dos ácidos graxos poli-insaturados).

Tabela 8 - Perfil de ácidos graxos dos sete fungos selecionados e cultivados a 15 °C.

Código	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1n9t	C18:1n9c	C18:2n6c	C20:0	C18:3n6	C20:1n9	C18:3n3	C21:0	C20:2 cis-11,14	C20:3n3 cis-11,14,17	ΣSFA	ΣMUFA	ΣPUFA
SP111	0,69	0,18	30,63	2,07	0,09	12,88	0,15	27,7	16,31	0,42	0,08	0,06	8,69	0,06	-	-	44,95	29,98	25,08
BA38	0,77	0,63	25,17	1,81	0,44	15,95	-	16,52	23,46	0,51	0,15	0,1	14,45	0,05	-	-	43,52	18,43	38,06
SO82	1,76	0,07	39,74	2,47	0,07	5,7	0,12	29,15	12,94	0,16	0,08	0,07	7,59	-	0,04	0,04	47,5	31,81	20,61
SPI42	1,87	0,44	33,01	2,69	0,41	12,33	-	13,12	23,93	0,32	0,14	0,1	11,53	-	-	0,12	48,38	15,91	35,72
SO71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SP1165	1,57	0,43	27,94	3,47	0,48	10,63	-	12,77	28,9	0,19	0,13	0,13	13,23	-	0,13	0,13	41,24	16,37	42,39
SP1153	0,93	0,13	28,75	1,57	0,16	8,98	0,29	14,32	32,12	0,25	0,13	0,1	12,07	-	0,09	0,1	39,2	16,28	44,51

Código - (nomenclatura dos fungos); C14:0 - (Ácido Mirístico); C15:0 - (Ácido Pentadecanóico); C16:0 - (Ácido Palmítico); C16:1 - (Ácido Palmitoléico); C17:0 - (Ácido Heptadecanóico); C18:0 - (Ácido Esteárico); C18:1n9t - (Ácido Eláidico); C18:1n9c - (Ácido Oléico); C18:2n6c - (Ácido Linoléico); C20:0 - (Araquídico); C18:3n6 - (Ácido γ -linolênico); C20:1n9 - (Ácido cis-11-Eicosenóico); C18:3n3 - (Ácido α -linolênico, ALA); C21:0 - (Eicosanóico); C20:2 cis-11,14 - (eicosadienóico); C20:3n3 cis-11,14,17-(eicosatrienóico, ETE); ΣSFA - (Somatória do ácidos graxos saturados); ΣMUFA - (Somatória dos ácidos graxos monoinsaturados); ΣPUFA (Somatória dos ácidos graxos poli-insaturados).

Para ambas as temperaturas investigadas, os ácidos graxos majoritários produzidos pelos os micro-organismos selecionados foram ácido palmítico (C16:0), ácido oléico (C18:1n9c – n-9), ácido linoleico (C18:2n6c - n-6) e ácido esteárico (C18:0). Dos ácidos graxos são essenciais para a dieta humana, verificou que o linoleico (C18:2n6c), representante da família ômega-6, variou entre 18,34 a 52,36%. O ácido oleico (C18:1n9c), da família ômega-9, apresentou concentração entre (12,30 e 34,76%). Em menor quantidade, se obteve o ácido α -linolênico (C18:3n3), da família ômega-3 que variou de 1,06 a 7,70%. O total de ácidos graxos insaturados (PUFA + MUFA) variou na faixa de 60-70% do total de ácidos graxos para todos os micro-organismos testados. Resultados semelhantes de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados encontrados nas amostras também foram observados em fungo da espécie *Paecilomyces persicinus* P-10 em cultivo submerso (PAPACHARILAOU; PISANO, 1984).

Avaliando os resultados apresentados nas Tabelas 7 e 8 é possível verificar diferenças no perfil de ácidos graxos quando o fungo é cultivado em diferentes temperaturas. A produção de ácido palmítico (C16:0) foi maior em praticamente todos os casos (a exceção foi o SO71) quando o fungo foi cultivado a 15 °C. Esta tendência se mantém quando analisado o total de ácidos graxos saturados (SFA), onde foi verificado um aumento médio de 40% na concentração quando o micro-organismo foi cultivado em temperatura de 15 °C. Por outro lado, o conteúdo de ácido linoléico (C18:2n6c) diminuiu com o decréscimo da temperatura, mantendo-se a tendência quando analisado o teor total de PUFA.

Em relação ao ácido α -linolênico (C18:3n3), representante da família n-,3 observou-se um aumento considerável da sua produção na temperatura menor. Esse resultado pode ser explicado, pois, a temperatura é o principal fator de regulação do grau de insaturações dos ácidos graxos nos organismos. As temperaturas baixas proporcionam maior número de insaturações (SILVA et al., 1998). Este comportamento pode ser atribuído ao papel adaptativo dos PUFAs na estabilização da membrana em condições de stress de temperaturas inferiores. Estes ácidos graxos podem desempenhar um papel fundamental na regulação da fluidez da membrana neste organismo, gratificando a diminuição da funcionalidade das biomembranas sob condições de estresse de frio. Esse fator também pode ser explicado quando em temperatura baixa, o oxigênio dissolvido se encontra em maior disponibilidade no meio de cultura para as enzimas dessaturase que são dependentes de oxigênio (COHEN et al., 1987), resultando assim na produção de ácidos graxos com maior número de insaturações. Quando

ocorre o aumento da temperatura, o grau de insaturação dos ácidos graxos dos lipídeos da membrana decresce, devido à supressão da dessaturação dos ácidos graxos e aceleração da síntese de um novo ácido graxo (MURATA; LOS, 1997).

Analisando os resultados das Tabelas 6-8, é possível verificar que a cepa SPII65 destaca-se das demais no que se refere à quantidade e qualidade do óleo microbiano produzido. Quando o micro-organismo foi cultivado a 28 °C, produziu elevado teor de PUFA (51,94%), dos quais os principais ácidos graxo insaturados são das famílias n-6 e n-9, enquanto que na temperatura de 15°C produziu elevado teor de ácido graxo da família n-3. Associado à qualidade dos ácidos graxos produzidas por esta cepa, a mesma foi a que apresentou o maior rendimento de lipídeos total entre as 150 isoladas (11,28%, p/p).

Por esta razão, esta cepa foi selecionada para a análise molecular, a qual foi identificada como sendo da espécie *Nigrospora* sp. Este gênero já foi reportado como micro-organismo potencial na produção de óleo microbiano. Peng e Chegn (2007) isolaram 5 gêneros de fungos com potencial na produção de óleo microbiano, dentre eles o *Nigrospora* sp., o qual produziu 21,3% (p/p) de óleo microbiano por fermentação em estado sólido. O resultado obtido por estes autores é similar ao deste trabalho. No entanto, pouca atenção tem sido dada a esta espécie de fungo para a produção de óleo microbiano, embora a mesma tem sido amplamente estudada para a produção de uma vasta gama de metabólitos secundários incluindo bioativos que inibem o crescimento de plantas *nigrosporolide* (HARWOOD et al., 1995), antibacterianos e *nigrosporins* fitotóxicos A e B (TANAKA, 1997). Na literatura os principais fungos encontrados com uma maior capacidade na produção de elevada taxa de lipídeos são principalmente das espécies de *Claviceps*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cunninghamella* (CARVALHO, 1994).

5.3 Avaliação dos efeitos de variáveis de processo no cultivo do fungo *Nigrospora* sp. e produção de óleo microbiano

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos no delineamento experimental do tipo Plackett-Burmann para avaliar o efeito das variáveis de processo no cultivo do fungo *Nigrospora* sp. para a na produção de óleo microbiano. As respostas avaliadas foram a concentração de biomassa, teor de lipídeos, teor de ácidos graxos saturados, ácidos graxos monoinsaturados e ácidos graxos poli-insaturados. 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 do planejamento do tipo Plackett-Burman para estudar a influência de variáveis de processo no crescimento microbiano e no acúmulo de lipídeos

Ensaio	T (°C)	Agitação (rpm)	pH	AMM (%, v/v)	Sacarose (g/L)	Biomassa	Teor de lipídeos	ΣSFA	ΣMUFA	ΣPUFA
						(g/L)	(%)	(%)	(%)	(%)
1	1 (25)	-1 (120)	1 (6)	-1 (5)	-1 (60)	4,52	5,54	20,91	43,04	36,04
2	1 (25)	1 (200)	-1 (4)	1 (15)	-1 (60)	2,56	2,45	25,96	42,68	31,35
3	-1 (15)	1 (200)	1 (6)	-1 (5)	1 (180)	13,35	2,36	23,74	20,54	55,72
4	1 (25)	-1 (120)	1 (6)	1 (15)	-1 (60)	5,42	2,84	19,08	41,68	39,22
5	1 (25)	1 (200)	-1 (4)	1 (15)	1 (180)	2,64	2,15	27,70	28,61	43,40
6	1 (25)	1 (200)	1 (6)	-1 (5)	1 (180)	3,9	3,68	28,26	43,92	27,82
7	-1 (15)	1 (200)	1 (6)	1 (15)	-1 (60)	10,61	2,50	23,72	21,43	54,84
8	-1 (15)	-1 (120)	1 (6)	1 (15)	1 (180)	7,62	2,38	32,00	28,32	39,68
9	-1 (15)	-1 (120)	-1 (4)	1 (15)	1 (180)	-	-	-	-	-
10	1 (25)	-1 (120)	-1 (4)	-1 (5)	1 (180)	9,52	2,04	32,45	47,96	19,58
11	-1 (15)	1 (200)	-1 (4)	-1 (5)	-1 (60)	2,64	2,89	24,57	19,64	55,75
12	-1 (15)	-1 (120)	-1 (4)	-1 (5)	-1 (60)	8,06	3,98	28,62	27,56	43,82
13	0 (20)	0 (160)	0 (5)	0 (10)	0 (120)	10,19	3,18	26,92	36,37	36,72
14	0 (20)	0 (160)	0 (5)	0 (10)	0 (120)	8,52	3,64	30,21	33,60	36,18
15	0 (20)	0 (160)	0 (5)	0 (10)	0 (120)	9,62	4,48	38,68	30,44	31,06

ΣSFA - (Somatória dos ácidos graxos saturados); ΣMUFA - (Somatória dos ácidos graxos monoinsaturados); ΣPUFA - (Somatória dos ácidos graxos poli-insaturados); AMM - (Água de maceração de milho).

A Tabela 10 apresenta o perfil de ácidos graxos correspondente aos experimentos do planejamento Plackett-Burmann. Os ácidos graxos majoritários obtidos nesta etapa foram similares aos obtidos anteriormente: ácido palmítico (C16:0), ácido oleico (C18:1n9c – n-9), ácido linoleico (C18:2n6c -n-6) e ácido esteárico (C18:0). O teor destes ácidos graxos variou entre os experimentos do planejamento, como uma consequência da variação das condições de cultivos. No entanto, em termos médios o teor foi similar ao obtido na etapa de *screening*. Um dos resultados mais promissores deste trabalho é no que se refere ao teor de ácido α -linolênico (C18:3n3), o qual é um ácido graxo da família n-3 e apresentou teor variando de 0 a 12,85%. Além disso, é possível constatar que as maiores produções de ácido α -linolênico ocorreram nos experimentos com temperatura menor (experimentos 3, 7 e 11), corroborando com os resultados obtidos na etapa de *screening*. Os ácidos graxos n-6 tiveram uma produção entre 30,19 e 43,56%, sendo as maiores concentrações destes ácidos graxos também obtidas nos experimentos 3, 7 e 11 realizados também na menor temperatura avaliada neste trabalho (15 °C).

Tabela 10 - Perfil dos ácidos graxos do fungo *Nigrospora* sp. obtidos nos experimentos do planejamento Plackett-Burmann.

Ensaio	C14:0	C14:1	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1n9c	C18:2n6c	C20:0	C18:3n6	C20:1n9c	C18:3n3	C21:0	C20:2	C22:0	C22:1n9	C20:3n3	C23:0	C22:2	C24:0
1	0,17	-	0,23	15,15	1,11	0,18	0,32	2,55	41,63	33,70	0,23	-	0,23	2,11	1,22	0,21	0,44	0,03	0,03	0,11	-	0,66
2	0,75	-	0,41	20,61	1,18	0,26	0,54	2,43	40,89	30,60	0,31	-	0,31	0,68	0,73	0,13	0,27	0,05	-	0,04	-	0,29
3	0,67	-	0,54	18,97	1,69	0,37	0,52	2,73	18,47	42,37	0,26	0,13	0,21	12,85	0,20	0,18	0,21	0,03	0,34	-	-	0,22
4	0,17	-	0,19	13,75	1,15	0,17	0,39	3,12	39,79	36,96	0,32	-	0,31	1,98	0,09	0,24	0,46	0,03	0,04	0,06	-	0,73
5	0,61	-	0,34	21,43	0,32	0,27	0,24	2,95	28,16	42,21	0,36	-	0,07	1,19	1,49	-	0,19	0,03	-	0,04	-	0,16
6	0,64	0,03	0,56	21,96	2,71	0,14	-	3,12	40,48	25,98	0,39	-	0,58	1,48	0,14	0,28	0,54	0,13	0,07	0,07	0,01	0,68
7	0,38	-	0,27	18,89	1,18	0,11	0,26	3,38	19,85	42,35	0,20	-	0,14	12,15	0,26	0,14	0,11	-	0,19	-	-	0,09
8	0,87	-	0,19	23,81	1,64	0,11	0,15	5,85	26,36	35,67	0,44	-	0,13	3,82	0,14	0,11	0,29	0,03	0,06	0,02	-	0,25
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	0,79	-	0,46	25,45	2,56	0,17	0,39	4,51	44,68	19,04	0,33	-	0,28	0,37	0,05	0,17	0,29	0,04	-	0,01	-	0,37
11	0,60	-	1,00	19,28	1,21	0,40	0,62	2,67	17,70	43,56	0,16	-	0,11	11,85	0,28	0,12	0,12	-	0,21	-	-	0,13
12	0,79	-	0,38	21,42	1,71	0,16	0,375	4,83	25,29	40,66	0,295	-	0,16	2,94	0,25	0,16	0,22	0,03	0,06	-	-	0,25
13	0,91	-	0,31	21,11	2,57	0,13	0,24	3,67	33,47	35,62	0,27	-	0,19	0,98	0,10	0,11	0,21	0,03	-	0,06	-	0,18
14	0,96	-	0,30	21,51	1,49	0,21	0,22	6,04	31,63	34,38	0,53	-	0,30	1,50	0,26	0,20	0,44	0,06	0,18	0,05	-	0,39
15	0,84	0,38	18,50	11,52	1,09	0,26	0,28	6,47	28,82	30,19	0,31	-	0,17	0,79	0,18	0,15	0,25	0,04	-	0,16	-	0,27

C14:0 - (Ácido Mirístico); C14:1 - (Ácido Miristoléico); C15:0 - (Ácido Pentadecanóico); C16:0 - (Ácido Palmítico); C16:1 - (Ácido Palmitoléico); C17:0 - (Ácido Heptadecanóico); C17:1 - (ácido heptadecenoico); C18:0 - (Ácido Esteárico); C18:1n9c - (Ácido Oléico); C18:2n6c - (Ácido Linoléico); C20:0 - (Araquídico); C18:3n6 - (Ácido γ -linolênico); C20:1n9 - (Ácido cis-11-Eicosenóico); C18:3n3 - (Ácido α -linolênico, ALA); C21:0 - (Enicosanóico); C20:2 cis-11,14 - (Eicosadienóico); C22:0 - (Ácido Behênico); C22:1n9 - (Ácido Erúico); C20:3n3 cis-11,14,17-(eicosatrienóico, ETE); C23:0 - (Ácido Tricosanóico); C22:2 - (ácido docosadienóico); C24:0 - (ácido lignocérico).

A Figura 3 apresenta os efeitos das variáveis independentes na produção de biomassa. Embora nenhuma variável tenha sido estatisticamente significativa ($p < 0.1$), é possível verificar a influência de algumas variáveis a partir dos dados da Tabela 9. O efeito negativo da temperatura é comprovado ao se analisar a concentração de biomassa nos experimentos conduzidos a 25 °C, as quais foram menores que as obtidas a 15 °C. Por outro lado, a concentração de biomassa foi sempre maior quando os experimentos foram conduzidos com pH maior que 5,0.

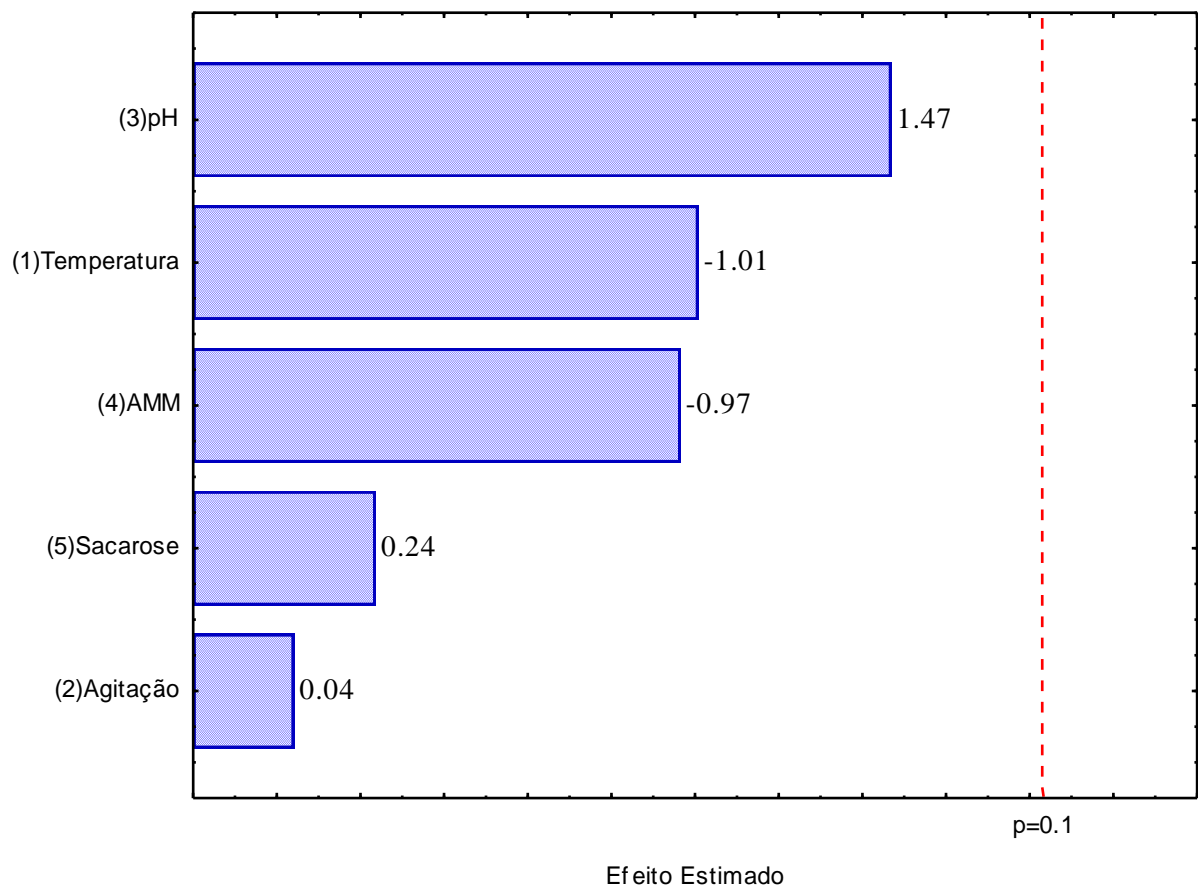


Figura 3 - Gráfico de Pareto expressando os efeitos das variáveis independentes na concentração de biomassa.

A Figura 4 apresenta os efeitos das variáveis independentes no teor de lipídeos total. A produção de lipídeos variou de 0,0% (experimento 9) a 5,54% (experimento 1). Comparando estes resultados com aqueles obtidos na etapa anterior (etapa de *screening*), pode-se verificar que houve uma redução no teor de lipídeos. Esta redução pode estar associada à composição do meio. O efeito negativo das concentrações de AMM e sacarose é um indicativo da

influência do meio na produção de lipídeos. O pH do meio apresentou efeito positivo na produção de lipídeos. Este resultado pode estar associado ao fato de que este micro-organismo não apresentou bom crescimento em pH mais baixo, afetando a produção de lipídeos. A temperatura e a agitação não apresentaram influência na produção de lipídeos.

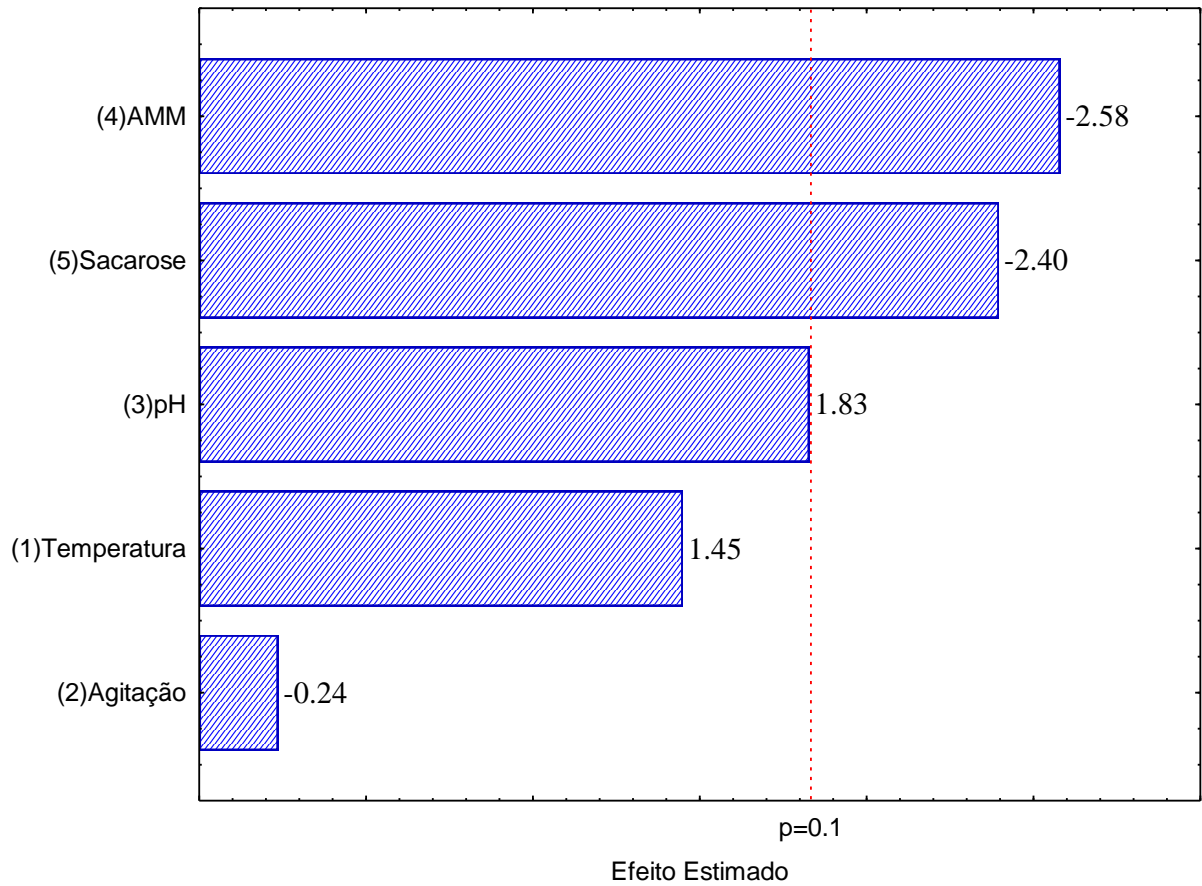


Figura 4 - Gráfico de Pareto expressando os efeitos das variáveis independentes no teor de lipídeos total.

A Figura 5 apresenta os efeitos das variáveis independentes no teor de ácidos graxos saturados, os quais apresentaram valores similares àqueles obtidos na etapa de *screening* para este micro-organismo. A partir da análise dos efeitos é verificado que nenhuma variável apresentou influência significativa na produção de ácidos graxos saturados. Este resultado é contraditório com aquele verificado na etapa de *screening*, onde a redução da temperatura levou ao aumento do teor de ácidos graxos saturados. Por outro lado, tem-se uma composição de meio de cultivo muito mais complexa, o que possivelmente influencia no metabolismo micro-organismo.

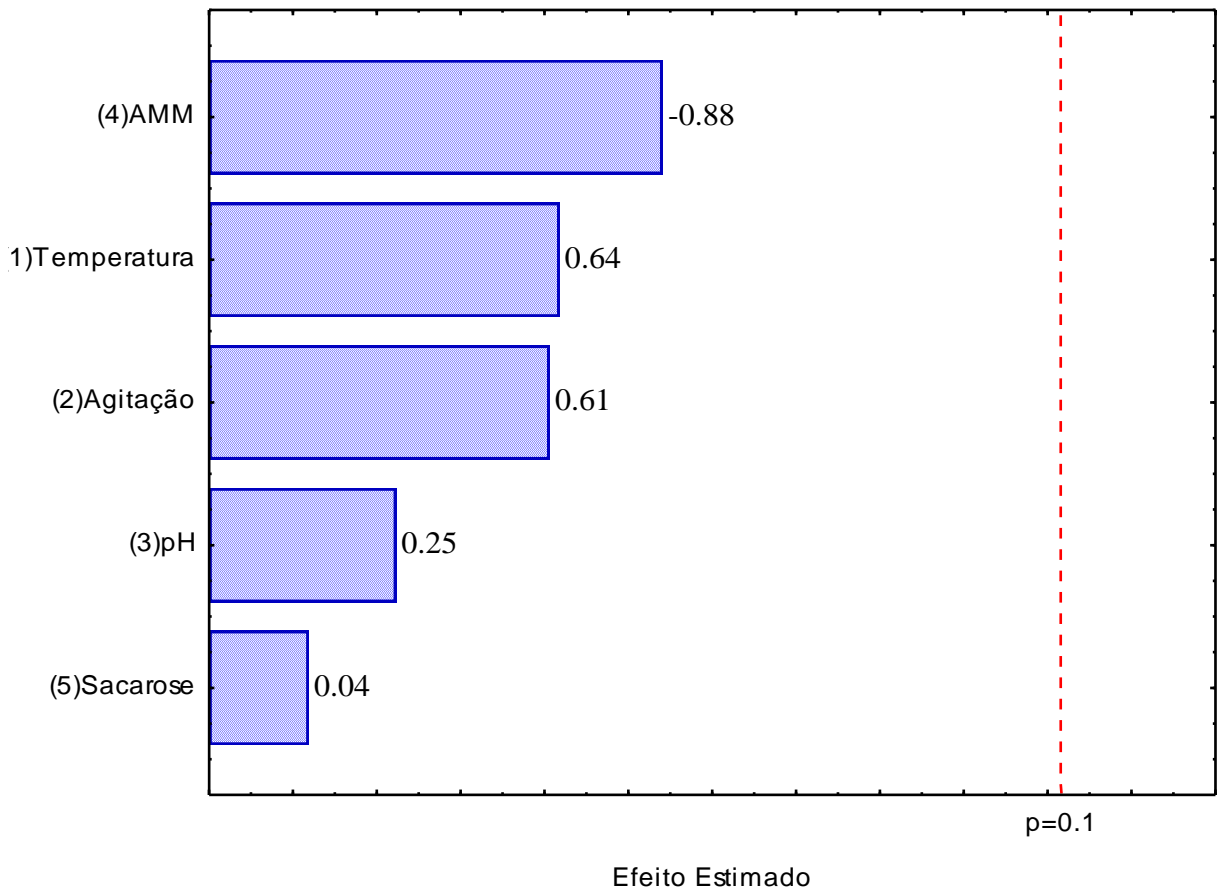


Figura 5 - Gráfico de Pareto expressando os efeitos das variáveis independentes no teor de SFA (ácido graxo saturado).

A Figura 6 apresenta os efeitos das variáveis independentes no teor de ácidos graxos monoinsaturados. A temperatura apresentou efeito significativo positivo no teor de MUFA. Este resultado corrobora com aqueles obtidos na etapa anterior, onde o aumento da temperatura levou ao incremento do teor de MUFA. As demais variáveis do processo não apresentaram influência significativa no teor de MUFA. Nesta etapa do trabalho, é possível verificar que o teor máximo de MUFA (47,96% - Experimento 10) foi maior que o dobro daquele obtido na etapa de *screening*. Com isso, pode-se inferir que a mudança da composição do meio de cultivo afetou positivamente o acúmulo de MUFA, embora a produção de lipídeos total tenha sido menor, o que afeta o rendimento do processo.

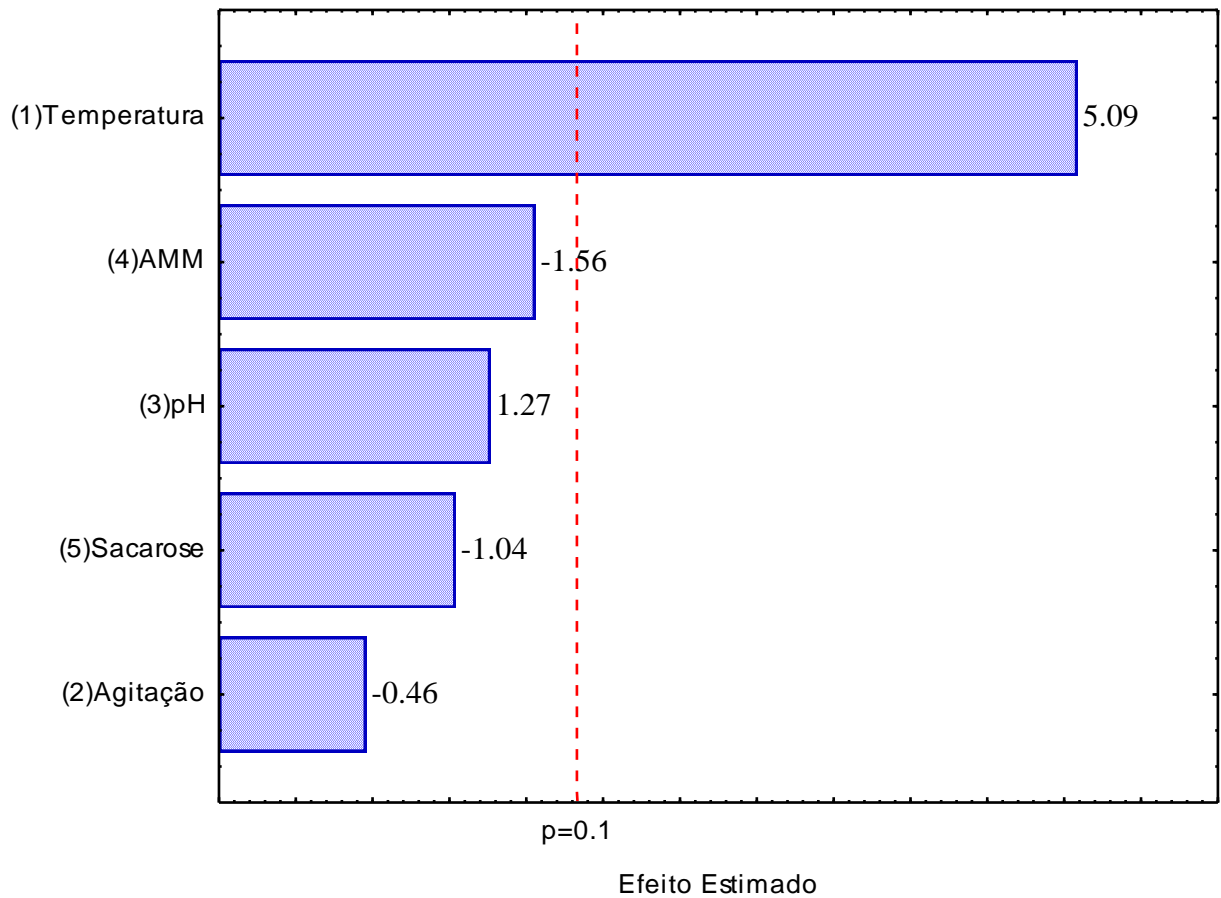


Figura 6 - Gráfico de Pareto expressando os efeitos das variáveis independentes no teor de MUFA (ácido graxo monoinsaturado).

A Figura 7 apresenta os efeitos das variáveis independentes no teor de ácidos graxos poli-insaturados. Os maiores teores foram obtidos nos experimentos 3,7 e 11, com teor aproximado de 55%, o qual é similar aquele obtido na etapa de *screening*. A concentração de sacarose apresentou efeito negativo no teor de PUFA, enquanto que a agitação apresentou efeito positivo. As demais variáveis não apresentaram efeito significativo no acúmulo de PUFA.

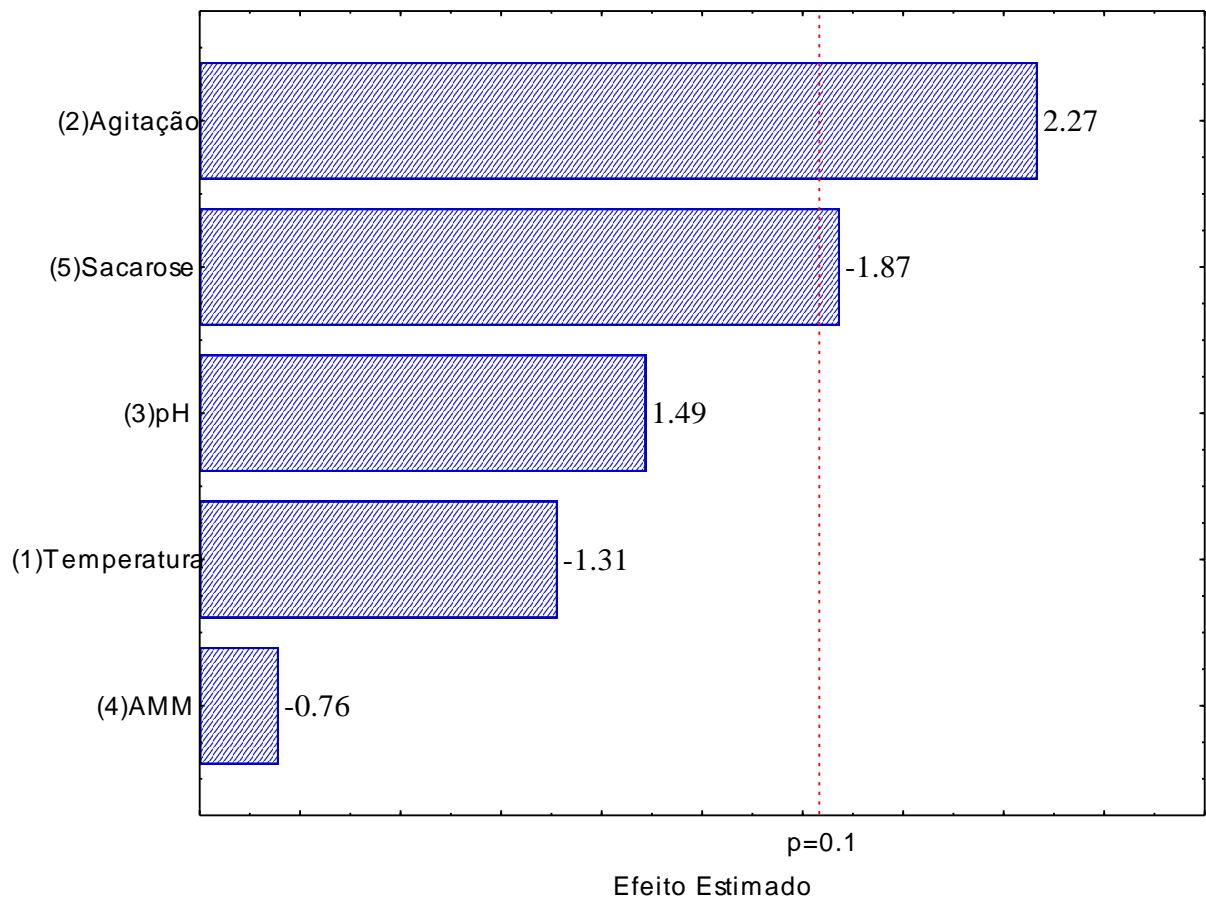


Figura 7 - Gráfico de Pareto expressando os efeitos das variáveis independentes no teor de PUFA (ácido graxo poli-insaturado).

Uma análise global dos resultados das Tabelas 6-8 e das Figuras 3-7, é possível verificar que a mudança do meio de cultivo afetou positivamente o acúmulo de PUFA pelo micro-organismo, por outro lado, o teor de lipídeos foi menor. Do ponto de vista de engenharia de processos, este resultado não é interessante, pois mesmo que a composição do óleo microbiano seja rica em MUFA e PUFA, o rendimento final do processo será afetado negativamente. A redução do custo do meio de cultivo é altamente desejável, porém será preciso encontrar alternativas para incrementar o acúmulo de lipídeos pelo micro-organismo.

5.4 Identificação Molecular do micro-organismo

Para a identificação do isolado SPII 65 foi realizada a comparação do fragmento sequenciado da região nrDNA (ITS1-5.8S-ITS2) com as sequências nucleotídicas depositadas no Banco de dados *GenBank*, utilizando a ferramenta *BLAST*. Diante dessa comparação o

isolado foi considerado pertencente ao gênero *Nigrospora*, com 100% de similaridade com a espécie *Nigrospora sphaerica*. Não foi possível realizar a identificação a nível de espécie desse isolado pois a região nrDNA (ITS1-5.8S-ITS2) não apresentou variação nucleotídica interespecífica suficiente para distinguir entre as espécies *Nigrospora sphaerica* JQ936183 (100% de similaridade) e *Nigrospora oryzae* KC954151 (99% de similaridade) Tabela 11.

Tabela 11 - Espécies mais similares a sequência da região nrDNA (ITS1-5.8S-ITS2), do isolado SPII 65, obtidas pela comparação realizada pela ferramenta *BLAST* no *GenBank*.

Espécie	Isolado	País	Nº acesso <i>GenBank</i>	Similaridade	Cobertura
<i>Sordariomycetes</i> sp.	DZY01	China	JX179222	100%	99%
<i>Nigrospora sphaerica</i>	MBP13D	Brasil	JQ936183	100%	99%
<i>Nigrospora</i> sp.	ELV3_14	Austrália	KF227842	100%	98%
<i>Nigrospora oryzae</i>	RMIT0601	Brasil	JQ936183	99%	98%
<i>Nigrospora sphaerica</i>	BPHB1	Malásia	KM510417	100%	97%
<i>Nigrospora</i> sp.	LH4	China	HQ832835	100%	97%
<i>Nigrospora sphaerica</i>	MBP18F	Brasil	JQ936184	99%	97%

6. CONCLUSÃO

Das 150 cepas fúngicas isoladas de plantas daninhas do Bioma Pampa visando a produção de lipídeos, sete se destacaram com maior produção. Destas cepas, a SPII65 do gênero *Nigrospora* sp. foi a que apresentou melhor resultado na produção de lipídeos em meio sintético, utilizando como substrato glicose, peptona e extrato de levedura a 15 °C e 28 °C. A 28 °C foi obtido o melhor resultado na produção de lipídeos e PUFA's, respectivamente com 11,28% e 51,94%, respectivamente, quando comparado aos valores encontrados em temperatura mais baixa, 15 °C, com 6,02% e 42,39%, respectivamente. Avaliando o perfil de ácidos graxos foi observado uma maior produção de n-3 na temperaturas de 15 °C, sendo produzidos 7,7% e 13,23% de ácido α -linolênico (n-3), a 28 e 15 °C, respectivamente.

Na análise do planejamento Plackett Burman as variáveis agitação e sacarose influenciaram significativamente na produção de PUFA's. Na produção de lipídeos, as variáveis AMM e sacarose foram estatisticamente significativas, sendo este efeito negativo. Através dos resultados obtidos percebe-se a importância da composição do meio de cultura, sendo a produção de PUFA's com meio industrial semelhante a produção em meio sintético, porém a quantidade de lipídeos acumulada foi inferior.

Neste trabalho, ácidos graxos poli-insaturados foram produzidos, porém ainda são necessários estudos adicionais avaliando diferentes composições para o meio de cultura, visando otimizar a produção e o perfil dos lipídeos produzidos, além de uma ampliação de escala a fim de reduzir custos com a produção destes ácidos graxos.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- 1- Otimização da produção de PUFAs em escala de bancada
- 2- Avaliar a produção de PUFAs em escala piloto
- 3- Avaliar o processo de extração e purificação de PUFAs das células microbianas
- 4- Avaliar a presença de cito toxinas

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa. Ed. UFV, p.382, 2007.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFON, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p.3389-3402, 1997.
- AMARETTI, A.; RAIMONDI, S.; SALA, M.; RONCAGLIA, L.; DE LUCIA, M.; LEONARDI, A.; ROSSI, M. (2010). Óleos de células individuais de levedura oleaginosa adaptado ao frio *glacialis Rhodotorula* DBVPG 4785. **Fábricas de células microbianas**.
- ARJUNA, A. Production of polyunsaturated fatty acids by fungi: Review. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 25, 2014.
- ASSY, N.; NASSAR, F.; NASSER, G.; GROSOVSKI, M. Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15(15), p. 1809–1815, 2009.
- BALDONI, D. B.; COELHO, G.; JACQUES, R. J. S.; SILVEIRA, R. M. B.; GREBENC, T.; ANTONIOLLI, Z. I. Brown rotting fungus closely related to *Pseudomerulius curtisii* (Boletales) recorded for the first time in South America. **Mycosphere**, v. 3(5), p.533–541, 2012.
- BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J. L.; MOLINA-JOUVE, C.; NICAUD, J. M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in lipid Research**, p. 375-387, 2009.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n.8, p.911-917, 1959.
- BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D´ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p.849-854, 2009.
- CARVALHO, O. P. **Produção de ácido gama linolênico por nova linhagem de *Mucor* sp e estudo das condições de fermentação**. 1994. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.
- CLEMENTE, M.; STOCCO, C.; MOCELIN, D.; FERNANDES, L. C. Ácidos graxos poliinsaturados n-3 e sua ação sobre o sistema imunitário. **Revista Brasileira de Nutrição esportiva**, 2007.
- COHEN, Z.; VONSHAK, A.; RICHMOND, A. “Fatty acid composition of *Spirulina* strains grown under various environmental conditions,” **Phytochemistry**, v. 26, n. 8, p. 2255–2258, 1987.

DELGADO, G.; SANTO-PIETRO, K. A. Microbial Volatile Organic Compounds (MVOC's); Fungus: *Nigrospora*. Environmental Reporter. **EM Lal**, v.4, 2006.

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

DEY, P.; BANERJEE, J.; MAITI, M. K. Comparativo perfil lipídico de dois fungos endofíticos isolados *Colletotrichum sp.* e *Alternaria sp.* Tendo utilitários potenciais como biodiesel de matériaprima. **Tecnologia Bioresource**, v.102, p.5815-5823, 2011.

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.

ECONOMOU, CH. N.; AGGELIS, G.; PAVLOU, S.; VAYENAS, D.V. A produção de petróleo a partir de uma única célula casca de arroz hidrolisado. **Bioresource Technology**, v.102, p.9737-9742, 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.

EVANS, C. T.; RATLEDGE, C. A. Comparison of the oleaginous yeast, *Candida curvata*, grown on different carbon sources in continuous and batch culture. **Lipids**, v.18, p.623-629, 1983.

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.

GOULART, A. C. P. **Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle**. Embrapa, Agropecuária Oeste, 2004.

HALL, T. A. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, n. 41, p.95-98, 1999.

HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 90 (1), p.420-426, 1978.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. **Laboratory Practice**, London, v.22, p.475-476, 1973.

HARWOOD, J. S.; CUTLER, H. G.; JACYNO, J. M. Nigrosporolide, a plant growth-inhibiting macrolide from the mould *Nigrospora sphaerica*. **Natural Product Letters**, v.6, p.181-185, 1995.

HOCH, J. A. Panspermia, spores and the *Bacillus subtilis* genome. **Nature**, v.390: p.237-238, 1997.

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.

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

KAMAT, S.; KHOT, M.; ZINJARDE, S.; RAVIKUMAR, A.; GADE, W. N. Juntamente produção de óleo de uma única célula como matéria prima do biodiesel, xilitol e xilanase a partir de bagaço de cana em um conceito beiorefinery usando fungos das wetlands tropicais dos manguezais. **Bioresource Tecnology**, v.135, p.246-253, 2013.

KANIA, C. E. **Isolamento e identificação de fungos associado ao café (*coffea arabica* L.) produzidos por sistema orgânico e convencional da variedade IAPAR 59**. 2014. Monografia, Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, 2014.

KHOT, M.; KAMAT, S.; ZINJARDE, S., PANT, A., CHOPADE, B.; RAVIKUMAR, A. (2012). Óleo de uma única célula de fungos oleaginosos dos manguezais tropicais como uma matéria prima potencial para biodiesel. **Fábricas celulares microbianas**.

KIRAN, E. U.; TRZCINSKI, A.; WEBB, C. Microbial óleo produzido a partir de subprodutos do biodiesel poderia aumentar a produção global. **Bioresource Techonology**, v.129, p.650-654, 2013.

KITCHA, S.; CHEIRSILP, B. Rastreo de leveduras oleaginosas e otimização para a produção de lipídeo usando glicerol em bruto como fonte de carbono. **Energia Procedia**, v.9, p.274-282, 2011.

KOUTB, M.; MORSY, F. M. A potent lipid producing isolate of *Epicoccum purpurascens* AUMC5615 and its promising use for biodiesel production. **Biomass Bioenerg**, v. 35, p.3182–3187, 2011.

KUMAR, C.G.; TAKAGI, H. Research review paper Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnol Advances**, v.17, p.561-594, 1999.

LEESING, R.; BAOJUNGHARN, R. Produção de petróleo microbiana por isolado oleaginosas Yeast *Torulaspora globosa* YU5 / 2. **Engenharia e Tecnologia**. v.5, 2011.

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 (1), p.73-79, 2008.

- LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 80, p. 749–756, 2008.
- LIANG, Y.; CUI, Y.; TRUSHENSKI, J.; BLACKBURN, J. W. Converting crude glycerol derived from yellow grease yeast fermentation through lipids. **Bioresource Technology**, v.101, p.7581-7586, 2010.
- LORENZI, H. Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional. 6^a.ed. Nova Odessa, SP: **Instituto Plantarum de estudo de Flora**, p. 339, 2006.
- MAHAN KL, ESCOTT-STUMP S. Krause alimentos, nutrição e dietoterapia. São Paulo, **Roca**, p.43-50, 2002.
- MAHECHA, H. S.; FRANCISCO, A.; BEIRÃO, L. H.; BLOCK, J. M.; SACCOL, A.; CARRASCO, S. P. Importância de ácidos graxos poli-insaturados presentes em peixes de cultivo e de ambiente natural para a nutrição humana. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28(1), p. 101 -110, 2002.
- MALAJOVICH M. A. **Biocologia**. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.
- MARTÍNEZ, E. J.; RAGHAVAN, V.; ANDRÉS, F. G.; GOMEZ, X. New Biofuel Alternatives: Integrating Waste Management and Single Cell Oil Production. **International Journal of Molecular Sciences**, p. 9385-9405, 2015.
- MENG, X., YANG, J., XU, X., ZHANG, L., NI, Q.; XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renew Energy**, 2009.
- MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi – Progress, obstacles and future trends. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 177-85, 2008.
- MULDER, E. G.; DEINEMA, M. H.; VAN VEEN, W. L.; ZEVENHUIZEN, L. P. T. M. Polysaccharides, lipids and poly-β-hydroxybutyrate in microorganisms. Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas, **Leiden**, v. 81, p. 797–809, 1962.
- MURATA, N.; LOS, D. Membrane fluidity and temperature perception. **Plant Physiology**, Washington, v.115, p.875-879, 1997.
- OYAMA, L. M.; ESTADELLA, D.; SILVA, M. S.; SILVA, M. H. G. G.; NASCIMENTO, C. M. O. Metabolismo lipídico. IN: DÂMASO, A. **Nutrição e exercício na prevenção de doenças**. Ed. Medsi, Rio de Janeiro, p. 81- 88, 2001.
- PAPACHARILAOU, E.; PISANO, M.A. Changes in the lipid composition of *Paecilomyces persicinus* P-10 M1 during growth and Cephalosporin C production. **Applied Environmental Microbiology**, v.48 (6), p.1084-1087, 1984.

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.; 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.

PARRA, P.; ALDRED, D.; MAGAN, N. Medium optimization for the production of the secondary metabolite. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 704–711, 2005.

PENG, X. W.; CHEN, H. Z. Microbial oil accumulation and cellulase secretion of the endophytic fungi from oleaginous plants. **Annals of Microbiology**, v.57, p. 239-242, 2007.

RASERA, K. **Utilização de sólido fermentado obtido a partir de fungos do gênero *rhizopus* como catalisador para modificação de óleos e gorduras**. 2012. 169 p. Tese (Doutorado em Ciências Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2012.

REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Química básica dos lipídeos. In: Oetterer, M. , Regitano-d'Arce, M. A. B. , Spoto, M. H. F. Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos. 1ª ed. Barueri: **Manole**, v. 1, p.196-242, 2006.

RIVAS, B.; MOLDES, A. B.; DOMÍNGUEZ, J. M.; PARAJÓ, J. C. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production. with *Lactobacillus Rhamnosus*. **International Journal of Food Microbiology**, p.97: 93–98, 2004.

SANTAMAURO, F.; WHIFFIN, F. M.; SCOTT, R. J.; CHUCK, C. J (2014). Baixo custo de produção de lipídeos na por leveduras oleaginosas cultivadas em condições não estéreis, utilizando recursos de resíduos como modelo. **Biotecnologia para Biocombustíveis**.

SANTOS, A.; XAVIER, N.; MOREIRA, Z. **Determinação de lipídeos pelos métodos de Soxhlet e Bligh-dyer**. SENAI – Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial, 2012.

SELBMANN, L.; ONOFRI, S.; FENICE, M.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. **Research in Microbiology**, v.153, p. 585–592, 2002.

SILVA, G. K. B. **Produção de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) por *cunninghamella elegans* ucp 542 em substratos alternativos**. 2011. 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

SILVA, M.; MANFIO, G. P.; CANHOS, V. P. Characterization of selected strains of mucorales using fatty acid profiles. **Revista Microbiologia**, v.29, p.276-281, 1998.

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

STADEN, R.; JUDGE, D. P.; BONFIELD, J. K. Analysing sequences using the staden package and EMBOSS. In: Introduction to bioinformatics: A theoretical and practical approach. Womble: **Human Press Inc**, p. 393–410, 2003.

TANAKA, M.; FUKUSHIMA, T.; TSUJINO, Y.; FUJIMORI, T. *Nigrosporins A and B*, new phytotoxic and antibacterial metabolites produced by a fungus *Nigrospora oryzae*. **Biotechnol Biochem**, v.61, p.1848–1852, 1997.

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.

WEI, A. L.; ZHANG, X.W.; WEI, D.; CHEN, G.; WU, Q. Y.; YANG, S. T. Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, p.1383–1389, 2009.

WEN Z, CHEN F. A perfusion-cell bleeding culture strategy for enhancing the productivity of eicosapentaenoic acid by *Nitzschia laevis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.57, p.316–322, 2001.

WILD, R.; PATIL, S.; PO POVIC, M.; ZAPPI, M.; DUFRECHE, S.; BAJPAI, R. Lipids from *Lipomyces starkeyi*. **Food Technol Biotech**, v.48, p.329–335, 2010.

YU, X.; HALLETT, S.G.; SHEPPARD, J.; WATSON, A.K. Effects of carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio on growth, conidiation, spore germination and efficacy of the potential bioherbicide *Colletotrichum coccodes*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 333–338, 1998.

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.

ZHANG, J.; FANG, X.; ZHU, X. L.; LI, Y.; XU, H. P.; ZHAO, B. F. Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O3 grown in fed-batch culture. **Biomass Bioenerg**, v. 35, p.1906–1911, 2011.

ZHANG, L.; WANG, S.; LI, X.; ZHANG, A.; ZHANG, Q.; GAO, J. New insight into the stereochemistry of botryosphaeridione from a *Phoma* endophyte. **Journal of Molecular Structure**, v. 1016, p. 72–75, 2012.

ZHAO, C. H.; ZHANG, T.; LI, M.; CHI, Z. M. Single cell oil production from hydrolysates of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke by *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. **Process Biochem**, v.45,p.1121–1126, 2010.

ANEXO

ANEXO A - Tabela 4 – Locais de coleta, plantas daninhas infectadas e isolados fúngicos por planta, testados para produção de lipídeos.

Localidade	Família botânica	Espécies de plantas daninhas	Nome popular	Código	Isolados
Dona Francisca (Quarta Colônia)-RS	Commelinaceae	<i>Commelina erecta</i>	trapoeraba	DF1	DF1.1 DF 1.2 DF 1.3 DF 1.4 DF 2.1 DF 2.2
	Solanaceae	<i>Solanum paniculatum</i>	jurubeba	DF2	DF 2.3 DF 2.4 DF 2.5
	Alismataceae	<i>Sagittaria montevidensis</i>	aguapé-de-flexa	DF3	DF3
	Solanaceae	<i>Solanum erianthum</i>	fumo-bravo	DF4	DF4.1 DF4.2 DF4.2
Restinga Seca (Quarta Colônia)-RS	Convolvulaceae	<i>Ipomoea triloba</i>	corriola	RS1	RS 1.1 RS 1.2 RS 1.3 RS 2.1 RS 2.2
	Poaceae	<i>Sorghum halepense</i>	capim-massambará	RS2	RS 2.3 RS 2.4 RS 2.5 RS 2.6 RS 2.7
Santiago (Vila Paraíso)-RS	Asteraceae	<i>Conoclinium macrocephalum</i>	eupatório-roxo	VP1	VP 1.1 VP 1.2 VP 2.1
	Passifloraceae	<i>Passiflora edulis</i>	maracujá-azedo	VP2	VP 2.2 VP 2.3 VP 4.1 VP 4.2 VP 4.3
	Solanaceae	<i>Solanum stipulaceum</i>	jurubeba-roxa	VP4	VP 4.4 VP 4.5 VP 4.6 VP 4.7 VP 4.8
	Solanaceae	<i>Solanum americanum</i>	maria-pretinha	VP5	VP 5.1 VP 5.2 VP 5.3
					VP 5.4 VP 5.5 VP 5.6

	Asteraceae	<i>Baccharis dracuntifolia</i>	vassoura-lajeana	VP6	VP 6.1 VP 6.2 VP 6.3 VP 6.4 VP 6.5 VP 6.6 VP 6.7 VP 6.8 VP 7.1 VP 7.2
	Apiaceae	<i>Eryngium horridum</i>	gravatá-do-banhado	VP7	VP 7.3 VP 7.4 VP 7.5 VP 7.6 VP 8.1 VP 8.2 VP 8.3
	Asteraceae	<i>Senecio brasiliensis</i>	maria-mole	VP8	VP 8.4 VP 8.5 VP 8.6 VP 8.7 VP 8.8
Plantas Ornamentais (Casa da Angélica) Santa Maria-RS	Araliaceae	<i>Schefflera actinophylla</i>	cheflera	OR1	OR 1.1 OR 1.2 OR 1.3 OR 2.1 OR 2.2 OR 2.3
	Orchidaceae	<i>Arundina graminifolia</i>	orquídea-bambu	OR2	OR 2.4 OR 2.5 OR 2.6 OR 2.7 OR 2.8
Santiago (Barragem)-RS	Asteraceae	<i>Baccharis articulata</i>	carquejado	BA1	BA 1.1 BA 1.2 BA 1.3 BA 1.4 BA 1.5 BA 2.1
	Asteraceae	<i>Solidago chinensis</i>	erva-lanceta	BA2	BA 2.2 BA 2.3 BA 3.1 BA 3.2
	Asteraceae	<i>Elephantopus mollis</i>	lingua-de-vaca	BA3	BA 3.3 BA 3.4 BA 3.5 BA 3.6 BA 3.7

				BA 3.8
				BA 3.9
				BA 3.10
				BA 3.11
				BA 3.12
				BA 3.13
				BA 3.14
				BA 4.1
	ND1	ND1	ND1	BA4
				BA 4.2
				BA 4.3
				BA 5.1
				BA 5.2
				BA 5.3
	Asteraceae	<i>Elephantopus angustifolius</i>	-	BA5
				BA 5.4
				BA 5.5
				BA 5.6
				BA 5.7
				BA 5.8
				BA 6.1
				BA 6.2
				BA 6.3
	Convolvulaceae	<i>Ipomoea triloba</i>	corriola	BA6
				BA 6.4
				BA 6.5
				BA 6.6
				BA 6.7
				SO 1.1
				SO 1.2
				SO 1.3
				SO 1.4
				SO 1.5
				SO 1.6
	Malvaceae	<i>Sida spinosa</i>	guanxuma	SO1
				SO 1.7
				SO 1.8
				SO 1.9
				SO 1.10
				SO 1.11
				SO 1.12
				SO 1.13
				SO 2.1
				SO 2.2
				SO 2.3
				SO 2.4
	Asteraceae	<i>Mikania cordifolia</i>	guaco	SO2
				SO 2.5
				SO 2.6
				SO 2.7
				SO 2.8
				SO 2.9
				SO 2.10

Santa Maria
(Campo
experimental -
SOJA)-RS

				SO 2.11
				SO 3.1
Poaceae	<i>Echinochloa colonum</i>	capim-arroz	SO3	SO 3.2
				SO 3.3
				SO 3.4
				SO 4.1
Asteraceae	<i>Biden pilosa</i>	picão-preto	SO4	SO 4.2
				SO 4.3
				SO 5.1
				SO 5.2
Convolvulaceae	<i>Ipomoea triloba</i>	corriola	SO5	SO 5.3
				SO 5.4
				SO 5.5
				SO 6.1
Convolvulaceae	<i>Ipomoea difusa</i>	corriola	SO6	SO 6.2
				SO 6.3
				SO 7.1
				SO 7.2
				SO 7.3
Poaceae	<i>Digitaria sanguinalis</i>	milhã	SO7	SO 7.4
				SO 7.5
				SO 7.6
				SO 7.7
				SO 7.8
				SO 8.1
				SO 8.2
Asteraceae	<i>Xanthium strumarium</i>	carrapichão	SO8	SO 8.3
				SO 8.4
				SO 8.5
				SO 9.1
				SO 9.2
				SO 9.3
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia heterophylla</i>	leiteiro	SO9	SO 9.4
				SO 9.5
				SO 9.6
				SO 9.7
				SO 10.1
				SO 10.2
				SO 10.3
Cyperaceae	<i>Cyperus</i> sp.	-	SO10	SO 10.4
				SO 10.5
				SO 10.6
				SO 10.7
				SO 10.8
				SO 11.1
Convolvulaceae	<i>Ipomoea triloba</i>	corriola	SO11	SO 11.2
				SO 11.3
				SO 11.4

	Brassicaceae	<i>Raphanus sativus</i>	Nabiça	SO12	SO 12.1 SO 12.2 SO 12.3 SO 12.4 SO 13.1 SO 13.2 SO 13.3
	Polygonaceae	<i>Polygonum hidropiperoides</i>	Erva-de-bicho	SO13	SO 13.4 SO 13.5 SO 13.6 SO 13.7 SO 13.8
São Sepé-RS	Poaceae	<i>Sorghum arundinaceum</i>	Sorgo selvagem	SPI1 SPII1	SPII1 SPII4 SPII14 SPII13 SPII11 SPII23
	Lamiaceae	<i>Hyptis suaveolens</i>	Cheirosa	SPII2	SPII22 SPII24 SPII37 SPII36 SPII32 SPII36
	Lamiaceae	<i>Marsypianthes chamaedrys</i>	Hortelão do campo	SPII3	SPII34 SPII31 SPII33 SPII35 SPII38
	Convolvulaceae	<i>Ipomoea purpurea</i>	Glória-da-manhã	SPI4 SPII4	SPI43 SPI41 SPI45 SPI42 SPII43 SPII42 SPII51 SPII53
	Asteraceae	<i>Tridax procumbens</i>	Erva-de-touro	SPII5	SPII54 SPII57 SPII56 SPII55 SPII63 SPII65
	Fabaceae	<i>Desmodium tortuosum</i>	Pega-pega	SPII6	SPII64 SPII62 SPII61

N/D: Planta não identificada