

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

SELEÇÃO DE LEVEDURAS OLEAGINOSAS
ISOLADAS DE QUEIJO ARTESANAL PRODUZIDO
NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Priscila Dallé da Rosa

Porto Alegre, dezembro de 2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

SELEÇÃO DE LEVEDURAS OLEAGINOSAS
ISOLADAS DE QUEIJO ARTESANAL PRODUZIDO
NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Priscila Dallé da Rosa

Trabalho de conclusão de Curso da Disciplina de Estágio
Curricular em Farmácia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Patricia Valente da Silva
Co-orientadora: MSc. Jandora Poli

Porto Alegre, dezembro de 2011.

*“Aos meus pais, irmão e
namorado que sempre me
motivaram, aconselharam,
confortaram e me fizeram
chegar aonde eu cheguei”*

Pensamento:

*"O que a mente do homem pode conceber e acreditar,
pode ser alcançada" (Napoleon Hill).*

Agradecimentos

Aos meus pais que sempre estiveram presente no meu desenvolvimento, me estimulando, aconselhando, me dando suporte tanto emocional quanto financeiro e embarcando comigo nas minhas escolhas.

Ao meu namorado por entender das minhas necessidades de tempo individual e não me deixar desistir em nenhum momento, mostrando-se sempre sólido e forte, sendo meu refúgio.

À Professora doutora Patricia Valente por ter aceitado me orientar nesse trabalho de conclusão; e que sempre se mostrou disponível para atender minhas dúvidas, sendo sempre excelente professora, demonstrando sua capacidade intelectual de maneira doce, com exemplos práticos para o mais fácil entendimento. Uma verdadeira líder, eficiente e ágil para todos os propósitos do grupo.

À Doutoranda e co-orientadora Jandora Poli por ter me escolhido, treinado, e me ensinado o caminho, pessoa de infinita qualidade, tem o dom para ensinar, e sempre fez um trabalho de incontestável qualidade.

Aos funcionários e colegas de laboratório por terem me dado tanto suporte técnico como moral.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram não somente para a realização desse trabalho, mas também para a realização e finalização desse curso e aos órgãos que me concederam as bolsas PIBITI CNPq-UFRGS e PROBITI FAPERGS-UFRGS.

Sumário

Resumo.....	11
1. Introdução	12
1.1 Utilização de óleos como alimento funcional	14
1.2 Rotas alternativas para síntese de biodiesel	18
1.3 Atividade antimicrobiana de óleos naturais	24
2. Objetivos	27
2.1 Objetivos Gerais	27
2.2 Objetivos Específicos.....	27
3. Material e métodos.....	28
3.1 Microrganismo	28
3.2 Condições de cultura.....	29
3.3 Avaliação do acúmulo de lipídeo em leveduras oleaginosas.....	29
3.4 Extração de lipídeo.....	30
3.5 Esterificação de lipídeo	31
3.6 Análises por Cromatografia Gasosa.....	32
3.6.1. Cromatografia Gasosa (CG).....	32
3.6.2 Reagentes e Solventes.....	33
3.6.3 Padrões.....	34
3.6.4 Colunas cromatográficas.....	34
3.6.5 Preparo das soluções padrão.....	34
4. Resultados.....	35
4.1 Avaliação do acúmulo de lipídeo em leveduras oleaginosas.....	35
4.2 Extração e análise de lipídeo.....	38
5. Discussão.....	44
6. Conclusão	49
7. Referências	50

Lista de figuras

Figura 1: Acúmulo de lipídeos em microrganismo explicado pela razão carbono/nitrogênio (C/N).....	13
Figura 2: Projeção das taxas de mortalidade prematura (<70 anos) pelo conjunto das quatro DCNT* no Brasil, 1991 a 2022. Meta: redução de 2% ao ano da taxa de mortalidade = 196/100 mil habitantes.....	17
Figura 3: Esquema da transesterificação de um triacilglicerídeo genérico com metanol.....	22
Figura 4: Mecanismo de uma transesterificação alcalina de triglicerídeo, onde B é uma base de Bronsted.....	22
Figura 5: Mecanismo de transesterificação em meio ácido.....	23
Figura 6: Equações da reação de transesterificação de um triacilglicerídeo com metanol catalisada por hidróxido de potássio.....	23
Figura 7: Fluxograma dos métodos empregados nos experimento com microrganismos.....	28
Figura 8: Esquema de um cromatógrafo gasoso.....	33
Figura 9: Linhagem de levedura observada em microscópio de fluorescência. Gotas lipídicas amarelo ouro indicam o acúmulo de óleo microbiano preenchendo entre 30 e 50% do seu volume celular na primeira imagem, a na outra indicam o acúmulo de óleo microbiano preenchendo mais de 80% do seu volume celular.....	35

Figura 10: Representação gráfica do experimento do acúmulo de lipídeo analisado com o fluorocromo Vermelho de Nilo no tempo de 72h, sendo o eixo x % do volume da gota lipídica intracelular, enquanto o eixo y é a porcentagem das 77 leveduras avaliadas.....36

Figura 11: Representação gráfica do experimento do acúmulo de lipídeo analisado com o fluorocromo Vermelho de Nilo no tempo mínimo de 24h, 48h e 72h sendo o eixo x as 24 linhagens das leveduras oleaginosas isoladas do queijo, enquanto o eixo y é a porcentagem do volume da partícula lipídica dentro da célula da levedura..... 37

Figura 12: Leveduras oleaginosas observados por microscópio de fluorescência nos tempos de 24, 48 e 72h com as respectivas leveduras QU 120, 50, 21, 33 e 67.....38

Lista de tabelas

Tabela 1: Rendimento percentual em duplicata do lipídeo em biomassa seca.....	39
Tabela 2: Número de célula do inóculo, com objetivo de verificar o crescimento das leveduras oleaginosas.....	40
Tabela 3: Representação de biomassa seca (X, g), do lipídeo (Y, g), lipídios na biomassa (YL = X, g / g), concentração de lipídios celulares([Y] , g / l) e concentração biomassa seca ([X] , g / l).....	41
Tabela 4: Representação de biomassa seca por grama de glicose do meio A (X/Glic, g/g), do lipídeo (Y/Glic, g/g).....	42
Tabela 5: Rendimento em % dos óleos das microalgas.....	45
Tabela 6: Produção de lípideo por vários microrganismos oleaginosos.....	46

Lista de abreviações

AMP	Adenosina 5'-monofosfato
ANP	Agência Nacional de Petróleo
C	Carbono
C/N	Carbono/Nitrogênio
CG	Cromatografia gasosa
CoA	Coenzima
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis.
GC-FID	Cromatógrafo gasoso com detector de ionizador de chamas
GLA	Ácido gama linolênico
L/B	Razão de lípideo em biomassa seca
MO	Microrganismo
MUFAs	Ácidos graxos monoinsaturados
MS	Ministério da Saúde
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
PUFAs	Ácidos graxos poliinsaturados
QU	Levedura da coleção do queijo

Resumo:

Algumas espécies de leveduras acumulam até aproximadamente 70% do peso seco em lipídeos. O alto teor de lipídeos produzidos, aliado à grande produtividade em biomassa, torna as leveduras excelentes candidatas para produção de óleo microbiano para diversas aplicações biotecnológicas. As etapas fundamentais no presente estudo foram seleção de leveduras boas produtoras de óleo microbiano, testando o seu tempo mínimo de acúmulo de lipídeo e a extração dos lipídios totais, e a esterificação, utilizando KOH 0,4M em metanol, H₂SO₄ 1M em metanol e n-hexano. Após a esterificação as amostras foram armazenadas a 0°C até a injeção no cromatógrafo a fim verificar o perfil lipídico intracelular das leveduras oleaginosas, visando o aproveitamento deste material para sua bioconversão em bioprodutos de alto valor agregado. A média do rendimento lipídico das duplicatas com relação ao peso seco da QU21 foi de 35,16%. Esta apresentou um perfil lipídico composto por C18:1 (ác. oléico), C16:0 (ác. palmítico), C18:0 (ác. esteárico), C16:1 (ác. palmitoléico), C17:1 (ác. heptadecanóico), C14:1 (ác. miristoléico) e C14:0 (ác. mirístico), podendo ser utilizada tanto para a produção de biodiesel, devido à grande quantidade de ácidos graxos saturados e de longas cadeias como em produtos nutracêuticos por causa do teor de ácidos graxos insaturados.

Palavras-chave: óleo microbiano, acúmulo de lipídeo, leveduras oleaginosas

1. Introdução

As leveduras são microrganismos tradicionalmente utilizados em processos fermentativos. Algumas espécies, como *Lipomyces starkeyi* acumulam até aproximadamente 70% do peso seco em lipídeos (Angerbauer *et al.*, 2008). O alto teor de lipídeos produzidos, aliado à grande produtividade em biomassa, torna as leveduras excelentes candidatas à produção de óleo microbiano para diversas finalidades. Os lipídeos produzidos pelas leveduras são classificados em neutros (triglicerídeos) e polares (glicolipídeos e fosfolipídeos), sendo a maior parte constituída por triglicerídeos saturados e monoinsaturados (MUFAs).

O principal fator que determina o acúmulo de lipídeos em microrganismos é a razão carbono/nitrogênio (C/N), sendo que o excesso de carbono e as condições limitantes de nitrogênio favorecem o processo (Figura 1). O microrganismo esgota rapidamente a fonte de nitrogênio, mas continua a assimilar a fonte de carbono, levando ao acúmulo de triglicerídeos. Para que haja síntese de lipídeos, é necessário um grande suprimento intracelular de acetil-CoA e de NADPH. As espécies de microrganismos oleaginosos possuem uma enzima, ATP citrato liase, que não é encontrada nas não-oleaginosas. Esta enzima catalisa a reação entre o citrato e coenzima A (CoA), formando acetil-CoA e oxaloacetato. A limitação de nitrogênio no meio de cultura induz uma cascata de acontecimentos que resulta no acúmulo de lipídeos. Inicialmente, há um aumento na atividade de AMP desaminase, diminuindo o conteúdo de AMP na célula. Essa diminuição na quantidade de AMP resulta na inibição da enzima isocitrato desidrogenase, que é dependente de AMP nos microrganismos oleaginosos. Portanto, o isocitrato não é metabolizado e é equilibrado com citrato via ação da aconitase, havendo acúmulo de citrato na mitocôndria. O citrato é exportado da mitocôndria por meio de um sistema de efluxo, entrando no citossol e sendo utilizado pela ATP citrato liase na formação de oxaloacetato e acetil CoA, que é utilizada na síntese de ácidos graxos. O oxaloacetato é convertido em malato no citosol e é utilizado no sistema de efluxo para saída do citrato da mitocôndria. O outro componente

essencial é o NADPH, que é produzido nos microrganismos oleaginosos via enzima málica. Esta enzima catalisa a reação entre o malato e NADP+, formando piruvato e NADPH (Wynn *et al.*, 1999). Enzimas alternativas geradoras de NADPH também podem estar presentes (Ratledge, 2004).

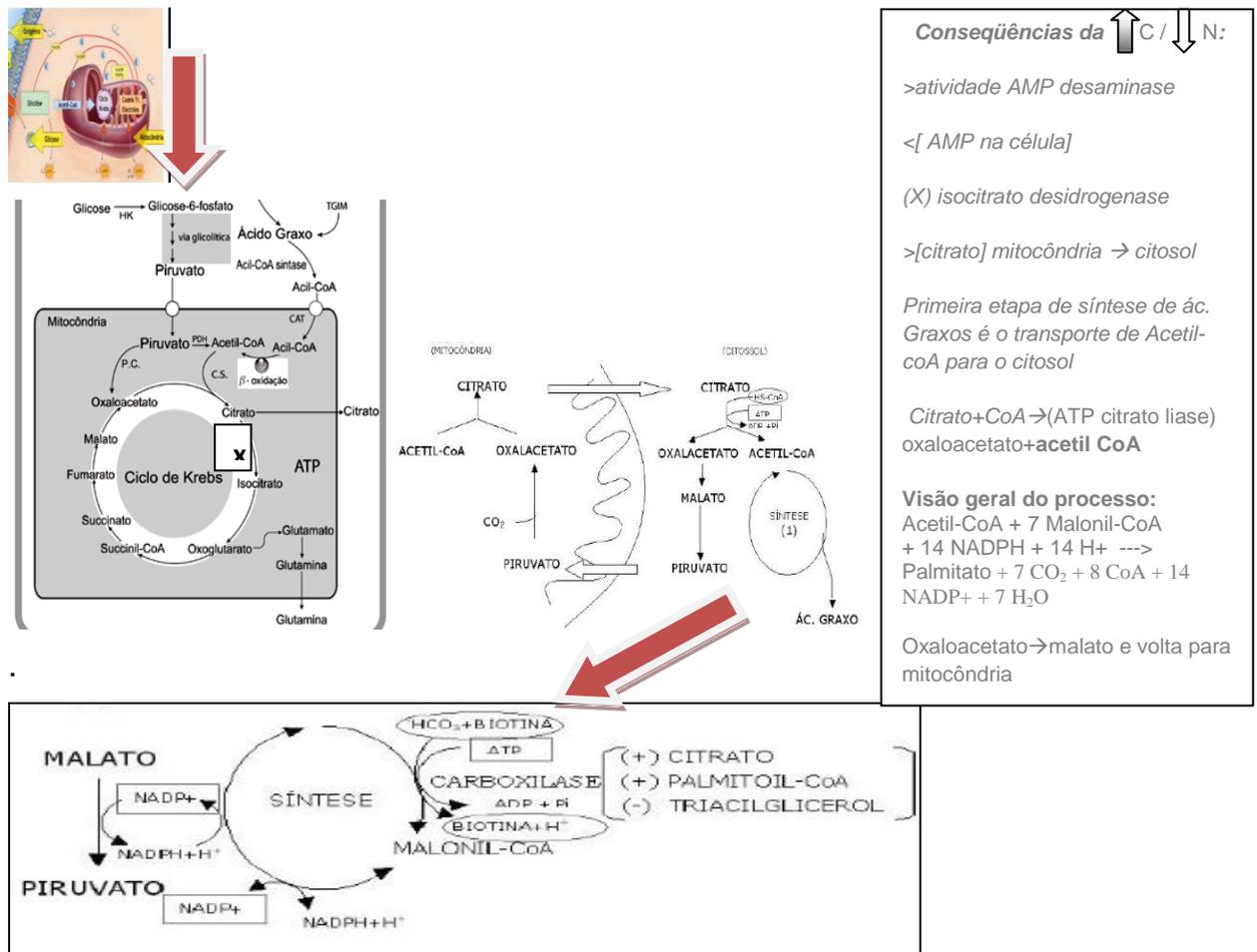


Figura 1: Acúmulo de lipídeos em microrganismos explicado pela razão carbono/nitrogênio (C/N). Adaptado do site: <http://www.slideshare.net/AlexandroSilvaNunes/bioquimica-usp-nutrio-e-esporte-uma-abordagem-bioquimica> (Acessado em 31 de outubro de 2011).

Além da razão C/N, os tipos de fonte de carbono e de nitrogênio também podem influenciar a produção de lipídeos. A fonte de carbono mais

utilizada nos meios sintéticos é a glicose, porém vários trabalhos têm sido dedicados à utilização de outras fontes presentes em material vegetal (amido e xilose) e resíduos agro-industriais. Um dos resíduos mais promissores é o glicerol, subproduto da síntese de biodiesel (Hou, 2008; Papanikoloau *et al.*, 2002, 2003). Com o aumento da produção de biodiesel, estima-se um aumento da síntese de glicerol que não será absorvido pela demanda atual da indústria farmacêutica. Uma das grandes preocupações atuais é o destino a ser dado a esse excesso de glicerol. A sua utilização como fonte de carbono para o cultivo de microrganismos oleaginosos seria a solução ideal. Em relação às fontes de nitrogênio, as orgânicas foram melhores para a produção de lipídeos pela levedura *Trichosporon fermentans*, porém fontes inorgânicas também são amplamente utilizadas (Zhu *et al.*, 2008).

Outro fator que também pode influenciar é a suplementação do meio de cultura com óleos vegetais. Neste caso, há a alteração da composição de ácidos graxos formados, podendo haver a produção de lipídeos com determinada composição de interesse (maior ou menor teor de ácidos graxos insaturados e de grau de insaturação) dependendo da manipulação da composição do meio de cultura (Jang *et al.*, 2005). A temperatura de incubação e o pH do meio de cultura também já foram relatados como fatores importantes (Zhu *et al.*, 2008), mas por enquanto foi mantido a temperatura ambiente, e o pH ainda não foi avaliado nos experimentos para produção de óleo microbiano.

1.1 Utilização de óleos como alimento funcional

Os alimentos funcionais devem apresentar propriedades benéficas além das nutricionais básicas, sendo apresentados na forma de alimentos comuns. São consumidos em dietas convencionais, que demonstram capacidade de regular as funções corporais de forma a auxiliar na proteção contra doenças como hipertensão, diabetes, câncer, osteoporose e coronariopatias (SOUZA *et al.*, 2003).

O escritório Americano de Contas Gerais (*US General Accounting Office-GAO*) define alimentos funcionais como alimentos que possuem

benefícios além da nutrição básica. Entretanto, o alimento funcional não tem nenhuma definição reconhecida pela FDC (*Food, Drugs and Cosmetics*). A FDA (*Food and Drug Administration*) regula os alimentos funcionais, com base no uso que se pretende dar ao produto, na descrição presente nos rótulos ou nos ingredientes do produto. A partir destes critérios, a FDA classificou os alimentos funcionais em cinco categorias: alimento, suplementos alimentares, alimento para usos dietéticos especiais, alimento-medicamento ou droga (Moraes & Colla, 2006). E a portaria nº 398, de 30/04/99, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde no Brasil diz que "*é alimento funcional todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos, fisiológicos ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica*" (ANVISA, 1999).

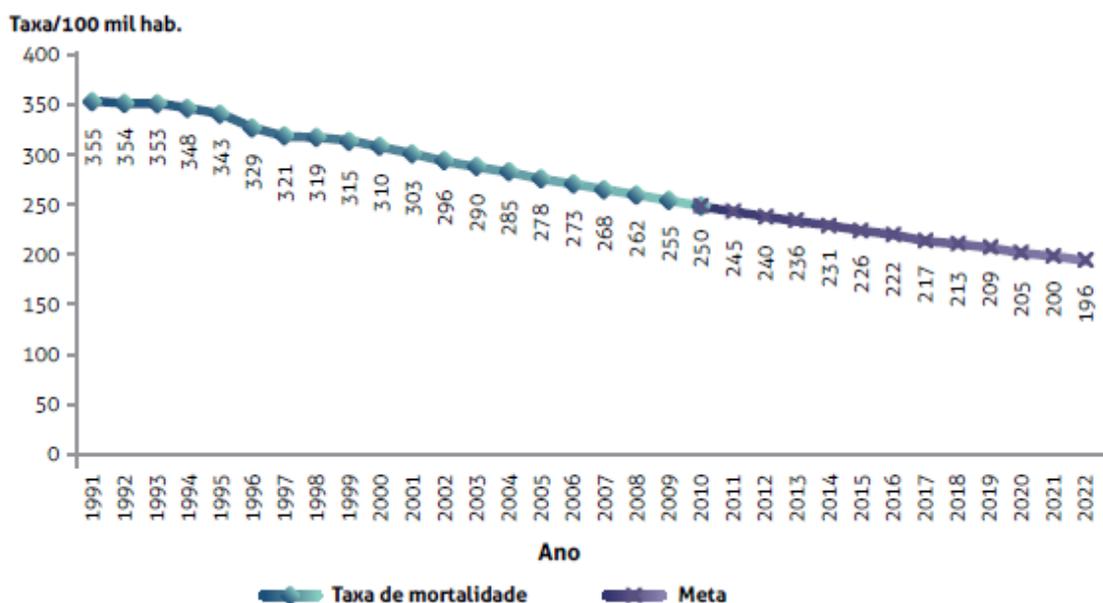
O termo nutracêutico define uma ampla variedade de alimentos e componentes alimentícios com apelos de saúde. Sua ação varia do suprimento de minerais e vitaminas essenciais até a proteção contra várias doenças infecciosas (HUNGENHOLTZ & SMID, 2002). Tais produtos podem abranger nutrientes isolados, suplementos dietéticos e dietas para alimentos geneticamente planejados, alimentos funcionais, produtos herbais e alimentos processados tais como cereais, sopas e bebidas (KWAK & JUKES, 2001a).

Estudos têm demonstrado que o consumo de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e poliinsaturados (PUFAs) traz benefícios à saúde humana. O principal problema é que os alimentos que ingerimos, na maioria das vezes, não fornecem a quantidade necessária destes ácidos graxos insaturados. A deficiência dessas "gorduras boas" na dieta, atualmente, é alarmante e está ligada a diversos problemas de saúde. Atualmente as principais fontes desse tipo de gordura para produção de nutracêuticos são vegetais como a oliva, a soja, a canola, o milho, o girassol, a linhaça e a abacate, além da gordura animal de alguns peixes, por exemplo, o salmão. Este tendo o inconveniente do gosto residual mínimo que fica retido nas papilas gustativas dos consumidores, mesmo sendo administrado na forma de cápsulas gelatinosas. Atualmente existem pesquisas com o objetivo de obter

fontes alternativas destes ácidos graxos, assim como sua suplementação em alimentos, objetivando ampliar a variedade de produtos ricos em MUFAs e PUFAs que estejam mais acessíveis ao consumidor. Como fontes alternativas para a obtenção de MUFAs e PUFAs encontram-se os microrganismos. Entre os microrganismos, os mais estudados para produção de óleo são as microalgas (Li *et al.*, 2008) e fungos oleaginosos (Zhu *et al.*, 2008), e também as leveduras, pois são capazes de acumular lipídeos, podendo produzi-los em escalas compatíveis com o uso industrial. Entre as vantagens do uso de leveduras para obtenção de óleo microbiano está o fato de que elas são facilmente cultivadas em biorreatores e de serem microrganismos geralmente reconhecidos como seguros para fins alimentícios. As leveduras produzem um alto teor de triglicerídeos monoinsaturados (MUFAs), cuja ingestão é de extrema importância para a saúde humana.

O efeito benéfico dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) e monoinsaturados (MUFAs), encontrados no azeite de oliva, óleo de soja, canola, entre outros, na diminuição do risco de doenças cardiovasculares tem sido alvo de estudos. Uma dieta rica em MUFAs (ácido oléico) conduz a uma redução da glicose e pressão arterial e aumenta os níveis do colesterol HDL (Julius, 2003). Existem evidências relacionando o baixo índice de doenças cardíacas e de desenvolvimento de tumores com o elevado consumo de azeite de oliva, principal fonte do ácido oléico (MUFA) pela população do Mediterrâneo (Assy *et al.*, 2009). Estudos mostraram que o elevado consumo de sal, baixo consumo de PUFAs, e elevado consumo de ácidos graxos *trans* são os riscos alimentares associados à maior mortalidade na população dos Estados Unidos (Danaei *et al.*, 2009). As doenças do aparelho circulatório - associadas à má alimentação, consumo excessivo de álcool, tabagismo e falta de atividade física – lideram o ranking e são as que mais matam homens e mulheres no Brasil. Como nos outros países, no Brasil, as doenças crônicas não transmissíveis também se constituem como o problema de saúde de maior magnitude. São responsáveis por 72% das causas de mortes, com destaque para doenças do aparelho circulatório (31,3%), câncer (16,3%), diabetes (5,2%) e doença respiratória crônica (5,8%), e atingem indivíduos de todas as

camadas socioeconômicas e, de forma mais intensa, aqueles pertencentes a grupos vulneráveis, como os idosos e os de baixa escolaridade e renda. Disponibilizado para consulta na publicação Saúde Brasil 2011 do MS http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/cartilha_dcnt_completa_portugues.pdf



Doenças do aparelho circulatório, câncer, diabetes e doenças respiratórias crônicas.

Fonte: CGDANT/SVS/MS.

Figura 2: Projeção das taxas de mortalidade prematura (<70 anos) pelo conjunto das quatro DCNT* no Brasil, 1991 a 2022. Meta: redução de 2% ao ano da taxa de mortalidade = 196/100 mil habitantes

Nas regiões do país, as doenças do aparelho circulatório são as que mais matam, com percentuais de 33% no Sudeste, 32,9% no Sul, 31,9 no Nordeste, 31% no Centro-Oeste e 24,9% no Norte (http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/SAUDE_BRASIL_2009_COLETIV_A.pdf). Portanto, existe uma grande deficiência no consumo de alimentos ricos

em MUFAs e em PUFAs e a suplementação desses alimentos com o objetivo de ampliar a variedade de produto, disponibilizando um maior teor destas “gorduras benéficas” na dieta alimentar, é de grande relevância.

1.2 Rotas alternativas para síntese de biodiesel: matéria-prima oleaginosa

A crise energética mundial tem levado à busca de alternativas para o uso de combustíveis fósseis, com o objetivo de controlar as alterações climáticas em escala mundial, sendo a principal alternativa o uso de biocombustíveis. O biodiesel apresenta desafios visando o aumento de sua competitividade econômica com os combustíveis fósseis e a diminuição/ausência de competição com cultivos vegetais com finalidades alimentícias. Dados do Fundo Monetário Internacional demonstram que os biocombustíveis foram responsáveis por quase metade do aumento no consumo de cultivos comestíveis nos anos de 2006/2007, exemplificando de forma incontestável essa competição combustível versus alimento. Sendo as leveduras microrganismos facilmente cultiváveis em escalas industriais, seu isolamento e exploração biotecnológica é um procedimento não destrutivo, com impacto ambiental negligenciável, e sem interferência com os cultivos vegetais utilizados para alimentação humana e animal.

Biodiesel é um combustível que pode ser gerado por craqueamento, esterificação ou transesterificação, sendo que as usinas de biodiesel utilizam principalmente a última. Neste processo, são utilizados óleo (vegetal, animal ou de outras fontes) e solvente orgânico (normalmente metanol ou etanol), juntamente com um catalisador (químico ou enzimático), produzindo ésteres de ácidos graxos (biodiesel), glicerol e alguns contaminantes. O Brasil possuía em janeiro de 2010 uma capacidade instalada e autorizada pela Agência Nacional de Petróleo (ANP) para produção de 4,7 bilhões de litros de biodiesel, porém a produção em 2009 foi de apenas 1,6 bilhões de litros (www.anp.gov.br). O principal problema apontado como causa da pouca produção é a baixa oferta de óleos vegetais a preços acessíveis para

a produção de biodiesel. O crescimento esperado da demanda de biodiesel no mercado nacional com a introdução do B5 torna os estudos na área de óleos que possam ser utilizados para produção do biocombustível uma questão de suma importância para o país, principalmente em vista das críticas mundiais referentes ao uso de plantações que deveriam estar destinadas ao consumo humano e/ou terra que deveria estar sendo utilizada para o mesmo fim. A tendência é que o problema se agrave e possa constituir uma barreira não tarifária para exportação de produtos agro-industriais brasileiros.

Os custos da produção de biodiesel dependem significativamente da matéria-prima utilizada (óleo de soja, dendê, mamona, algodão, girassol) e da região do país onde ocorre a produção do biocombustível. Portanto, a fonte de triglicerídeos utilizados atualmente na produção de biodiesel é um dos fatores de preocupação quanto à viabilidade da produção do biocombustível. Devido à grande biodiversidade, diversidade climática e condições do solo, o Brasil possui grandes fontes de óleo vegetal como óleo de soja, de algodão, de palma, coco, canola, dendê, mamona, pinhão manso e outros. Indubitavelmente, pelo fato do Brasil ser, atualmente, o segundo maior produtor mundial de soja e ter uma indústria de processamento dessa oleaginosa muito bem desenvolvida, esta fonte de óleo ocupou uma posição proeminente no desenvolvimento do Biodiesel (Parente, 2003; Pousa *et al.*, 2007). Porém, as principais desvantagens no uso de plantas oleaginosas como fontes de óleo são: (i) utilização de plantas obtidas apenas por extrativismo; (ii) sazonalidade de algumas culturas; (iii) óleo obtido de apenas parte da planta, normalmente a semente, diminuindo o rendimento; (iv) utilização de grandes áreas agrícolas para cultivo de plantas visando extração de óleo; (v) competição com atividades do setor de alimentos, resultando em diminuição da área plantada para alimentação e conseqüente aumento do custo dos alimentos; (vi) pressão internacional para redução do uso de vegetais na produção de biocombustíveis.

Pesquisas com o objetivo de aprimorar as culturas vegetais para produção de óleo estão sendo incentivadas (Meka *et al.*, 2006), porém também é interessante avaliar outras fontes de óleo além das plantas, já que o biodiesel

pode ser produzido a partir de qualquer fonte de triglicerídeos (Canakci & Sanli, 2008). Entre as fontes alternativas de óleo está a gordura animal (cujo uso não é totalmente aceito), óleo de frituras (cuja disponibilidade não é adequada para sustentar uma usina de biodiesel) e microrganismos. Entre os microrganismos, existem relatos da produção de biodiesel a partir de óleo de microalgas (Chisti, 2007; Li *et al.*, 2008) e de fungos oleaginosos (Zhu *et al.*, 2008). Porém estes dois grupos microbianos produzem óleos ricos em PUFAs. Esse tipo de ácido graxo é susceptível à oxidação durante a estocagem, sendo que o óleo utilizado para biodiesel deve conter pouca quantidade desses ácidos graxos para aumentar a estabilidade à oxidação e, portanto, aumentar a estabilidade na estocagem (Gema *et al.*, 2002; Jang *et al.*, 2005; Koike *et al.*, 2001; Papanikolaou *et al.*, 2004).

Outros microrganismos também são capazes de acumular lipídeos, podendo produzi-los em escalas compatíveis com o uso industrial. Como dito anteriormente, apesar de todos os seres vivos serem capazes de sintetizar lipídeos, apenas poucas espécies de microrganismos são capazes de acumular mais de 20% da massa celular na forma de lipídeos usados como reserva energética. As bactérias, por exemplo, produzem outros materiais de reserva como o poli-hidroxi-butirato ou alcanoato (Tortora, 2000). Portanto, o acúmulo de triglicerídeos fica restrito às leveduras, a fungos filamentosos e algumas algas (Ratledge, 2004). A maior parte dos lipídeos produzidos pelas leveduras é constituída por triglicerídeos saturados e MUFAs, ideais para a produção de biodiesel.

A produção atual de biodiesel é feita na maior parte utilizando fontes vegetais oleaginosas, cuja produção é sazonal. O emprego de óleo de levedura como matéria-prima soluciona vários problemas das fontes vegetais, incluindo a sazonalidade, levando à diversificação da produção nacional de matéria-prima para produção de óleo. A fonte microbiana proposta irá desestimular a expansão injustificada da fronteira agrícola e deverá ser ainda mais importante em centros urbanos, onde o cultivo de outras fontes vegetais em escalas compatíveis para a produção de biodiesel é inviável.

Uma forma de transformar triglicerídeos em combustível é a transesterificação, como já foi citado, onde ocorre a reação de mono-álcoois de cadeias curtas em presença de um catalisador, dando origem a monoésteres de ácidos graxos (Figura 3). Sendo composta de três reações consecutivas e reversíveis, nas quais são formados diglicerídeos e monoglicerídeos como intermediários (Suarez *et al*, 2007). Apesar da estequiometria geral da equação requerer três mols do mono-álcool para cada mol de triglicerídeo, para isso acontecer é necessário um excesso de álcool no meio reacional para assim aumentar o rendimento do éster, bem como permitir a sua separação do glicerol formado, já que há reversibilidade das reações. Sendo importante a presença de água para o equilíbrio entre os diferentes ésteres e seus respectivos ácidos graxos e álcoois (glicerol e/ou mono-álcoois). Entre os vários tipos de catalisadores estudados para a reação de transesterificação, os mais tradicionais são as bases e ácidos de Bronsted, sendo os principais exemplos os hidróxidos e alcóxidos de metais alcalinos, e os ácidos sulfúrico, fosfórico, clorídrico e organossulfônico, que esta demonstrado o mecanismo de ação genérico nas Figuras 4 e 5, onde a carbonila do triglicerídeo sofre um ataque nucleofílico do alcóxido, conforme a reação (ii), formando o éster de monoálcool e o ânion, o qual, após a desprotonação do ácido conjugado da base formado na reação, regenera a base de partida e produz, neste caso, um diglicerídeo. Reações similares irão ocorrer com os diglicerídeos formados, produzindo monoglicerídeos, os quais, em processos similares, formarão finalmente a glicerina (Figura 3 e 6). E quando ocorre uma transesterificação com um catalisador ácido, a carbonila do triglicerídeo, sofre um ataque eletrofílico do H⁺, conforme a reação (i), formando um carbocátion. A seguir, este carbocátion sofre um ataque nucleofílico de uma molécula do mono-álcool, formando um intermediário tetraédrico, conforme a reação (ii). Então, ocorre a eliminação de, neste caso, um diglicerídeo e um éster graxo do mono-álcool, juntamente com a regeneração da espécie H⁺. Por processos semelhantes serão formados os monoglicerídeos e a glicerina (figura5).

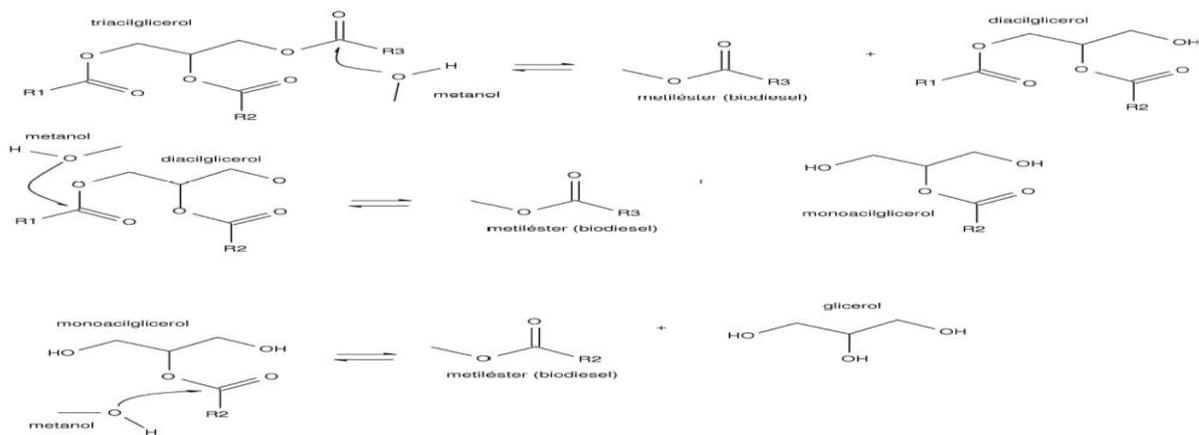


Figura 3: Esquema da transesterificação de um triacilglicerídeo genérico com metanol (Suarez *et al.*, 2007).

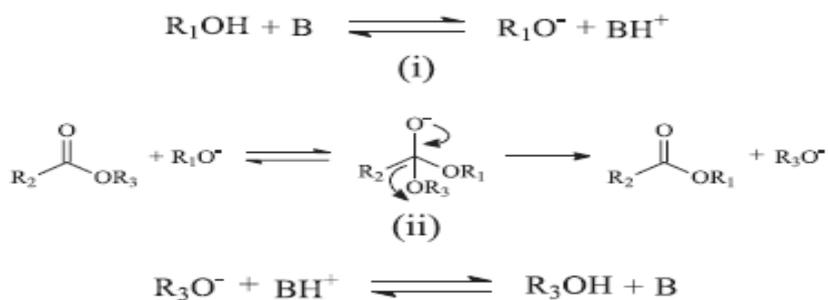


Figura 4: Mecanismo de uma transesterificação alcalina de triglicerídeo, onde B é uma base de Bronsted (adaptado de Suarez *et al.*, 2007).

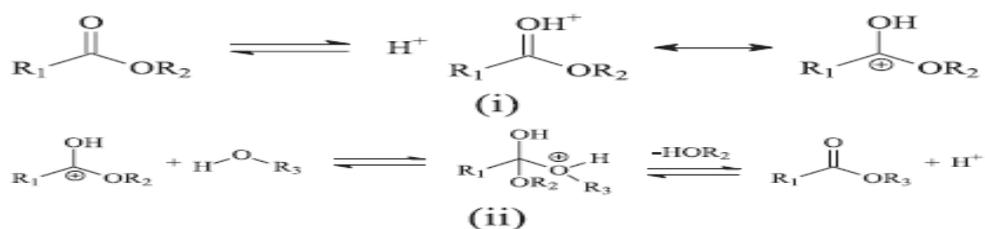


Figura 5: Mecanismo de transesterificação em meio ácido (adaptado de Suarez *et al.*, 2007)

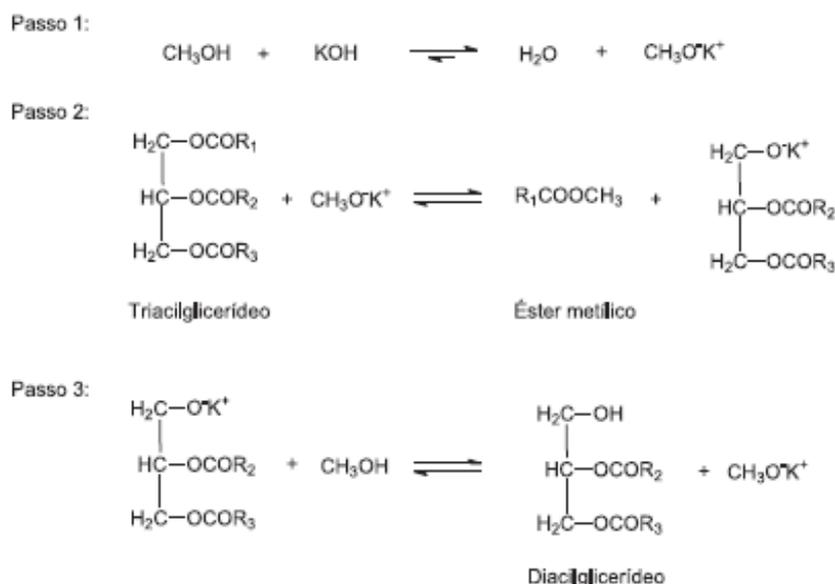


Figura 6: Equações da reação de transesterificação de um triacilglicerídeo com metanol catalisada por hidróxido de potássio (Geris *et al.*, 2007)

O primeiro passo é a reação da base com metanol, produzindo alcóxido (base conjugada) e água (ácido conjugado). O alcóxido, agindo como nucleófilo, ataca o átomo de carbono deficiente em elétrons do grupo carbonila do triacilglicerídeo; a ruptura da ligação entre carbono e oxigênio do glicerídeo no intermediário tetraédrico conduz ao produto carbonilado (éster metílico) e ao diacilglicerídeo, este último formado após a remoção do átomo de hidrogênio do metanol, obtendo o ânion metóxido, permitindo a continuidade do processo reacional (Geris *et al.*, 2007).

Com relação ao agente transesterificante, o processo reacional ocorre preferencialmente com álcoois de baixa massa molecular, como por ex., metanol, etanol, propanol, butanol e álcool amílico. Metanol é o mais utilizado

devido ao seu baixo custo na maioria dos países e às suas vantagens físicas e químicas (polaridade, álcool de cadeia mais curta, reage rapidamente com o triacilglicerídeo e dissolve facilmente o catalisador básico). Além disso, permite a separação simultânea do glicerol. A mesma reação usando etanol é mais complicada, pois requer um álcool anidro, bem como um óleo com baixo teor de água para levar à separação do glicerol. Os catalisadores básicos mais comuns são KOH e NaOH onde foram observados maior rendimento e seletividade.

1.3 Atividade antimicrobiana de óleos naturais

Existem relatos na literatura do potencial antimicrobiano de ácidos graxos, produzidos como uma defesa natural contra microrganismos patogênicos (Smith et al., 2010). O espectro de ação e a potência são influenciados pelo grau de insaturação, tamanho da cadeia de carbono e orientação das ligações duplas (*cis* ou *trans*). Entre os ácidos graxos livres saturados, o ácido cáprico (C10:0) e o ácido láurico (C12:0) são os mais ativos, enquanto entre os MUFAs, os mais ativos são o ácido miristoléico (C14:1) e ácido palmitoléico (C16:1). Muitos PUFAs com 18 e 20 carbonos possuem atividade antimicrobiana bastante potente, e geralmente os ácidos graxos *cis* são mais ativos do que os *trans*. O principal alvo da ação dos ácidos graxos em bactérias é a membrana celular, onde causam a disrupção da cadeia de transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa. Eles também podem inibir atividades enzimáticas, impedir a entrada de nutrientes na célula, gerar produtos de degradação que causam peroxidação e causar a lise celular direta (Desbois & Smith, 2010).

Recentemente, investigações acerca do potencial antimicrobiano *in vitro* de ácidos graxos livres e seus ésteres de etila e/ou metila contra patógenos bucais tem demonstrado a viabilidade do uso desses ácidos como agentes terapêuticos capazes de incrementar a saúde bucal. Aparentemente, a especificidade de ação do ácido graxo está relacionada à espécie de microrganismo alvo, sendo os ácidos fórmico, cáprico e láurico amplamente

inibitórios para bactérias Gram positivas (Huang et al., 2011). Ácidos graxos mono (MUFAs) e poliinsaturados (PUFAs), além de seus ésteres, também têm demonstrado forte capacidade antimicrobiana (Huang et al., 2010 a,b).

Também foram demonstrado que *Helicobacter pylori* é rapidamente inibido por ácidos graxos de cadeia média (C10:0 a C14:0) e exibe uma menor frequência de desenvolvimento de resistência espontânea a ácidos graxos do que a metronidazol e tetraciclina Petschow et al. (1996). Apesar de a maior ação ser, aparentemente, contra bactérias Gram positivas, (Wille & Kydonieus, 2003) relataram que ácido palmitoléico em combinação com etanol possui um efeito sinérgico contra bactérias Gram negativas. A maior resistência das bactérias Gram negativas é relacionada à presença de lipopolissacarídeos na membrana externa, que funcionam como uma barreira e impedem o acúmulo de ácidos graxos no interior da célula. Tratamento com substâncias que removem a camada de lipopolissacarídeos, como etilenodiaminotetraacetato, torna esses microrganismos sensíveis aos ácidos graxos (Sheu & Freese, 1973). A susceptibilidade de várias bactérias patogênicas, como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Escherichia coli*, aos ácidos graxos e seus derivados já foi amplamente demonstrada na literatura (Levison 1973; Marounek et al., 2003; Miller et al., 1977; Nobmann et al., 2009; Skrivanová et al., 2005), incluindo a inibição da formação de biofilmes.

De forma geral, existem menos relatos acerca da inibição de fungos por ácidos graxos. Liu et al. (2008) avaliaram a utilização desses ácidos no controle de fungos fitopatogênicos, tanto *in vitro* como *in situ*. Os ácidos graxos saturados demonstraram capacidade inibitória *in vitro* mais potente do que os insaturados, sendo capazes de inibir o crescimento do micélio fúngico e a germinação de esporos. Em experimentos a campo, uma mistura de ácidos palmítico e oléico no solo foi capaz de melhorar o crescimento de plântulas de tomate e pepino. Clément et al. (2008) conseguiram inibir *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* utilizando ácidos graxos livres provenientes da saponificação de lipídeos do leite. O composto mais potente foi o ácido gama-linoléico, porém ácido cáprico, ácido lauroléico, ácido metildodecanóico e ácido

miristoléico também tiveram atividade antifúngica. Apesar de *Candida albicans* de cavidade bucal ser menos sensível à ação dos ácidos graxos e derivados que as bactérias bucais (Huang et al., 2011), ainda é inibida (Huang et al., 2010 a,b).

Entre os produtos naturais, os óleos são talvez os menos estudados. Diversas aplicações biotecnológicas são possíveis, tanto a partir dos ácidos graxos livres quanto de seus derivados, como ésteres de etila, ésteres de metila, ésteres de açúcares, ácidos graxos e óleos oxigenados, álcoois e amins graxas etc. Esses óleos e derivados podem ser obtidos de organismos vivos, como plantas, animais e microrganismos, ou podem ser produtos de biotransformações realizadas por microrganismos. De qualquer forma, os lipídeos e óleos representam uma enorme oportunidade para exploração biotecnológica (Hou, 2008) e a pesquisa de novas fontes de óleo e de suas aplicações deve ser amplamente incentivada.

Aplicações farmacológicas dos ácidos graxos e seus derivados podem incluir: formulações tópicas para o tratamento de infecções bacterianas, antimicrobianos em curativos para ferimentos, conservantes em produtos para a pele e cabelo, produtos para higiene oral, etc. O emprego dos óleos na formulação de nanocápsulas capazes de liberar os fármacos de forma controlada é um avanço extremamente importante da nanotecnologia aplicada à área farmacêutica. Além disso, podem ser utilizados como conservantes em alimentos, onde o uso de outros agentes antimicrobianos não é desejável. Outra aplicação é na suplementação de ração animal, já tendo sido demonstrado que rações suplementadas com ácido butírico, ácidos graxos de cadeia média e/ou óleos essenciais são capazes de diminuir a incidência de doenças em aves (Timbermont et al., 2010). Ainda em relação à indústria avícola, Hinton & Ingram (2005) demonstraram que a lavagem das carcaças com misturas de trifosfato de potássio e ácidos graxos são úteis como bacteriostático para diminuir a população de bactérias e leveduras patogênicas e deterioradoras associadas com as operações de processamento industrial.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi verificar o acúmulo de lipídeo em leveduras, e selecionar as boas produtoras de óleo microbiano afim de, posteriormente, caracterizar o perfil lipídico intracelular da levedura oleaginosa, visando o aproveitamento deste material para sua bioconversão em bioprodutos de alto valor agregado.

2.2 Objetivos Específicos

- 1- Selecionar as leveduras oleaginosas a partir da coleção de leveduras isoladas de queijo artesanal no Rio Grande do Sul, Brasil;
- 2- Avaliar o rendimento de lipídeos produzidos pelas leveduras oleaginosas em meio contendo razão C:N 100:1, usando glicose como fonte de carbono;
- 3- Caracterizar os lipídeos produzidos por uma levedura oleaginosa através de cromatografia gasosa e avaliar a sua potencial aplicação biotecnológica.

3. Materiais e Métodos

○ Fluxograma

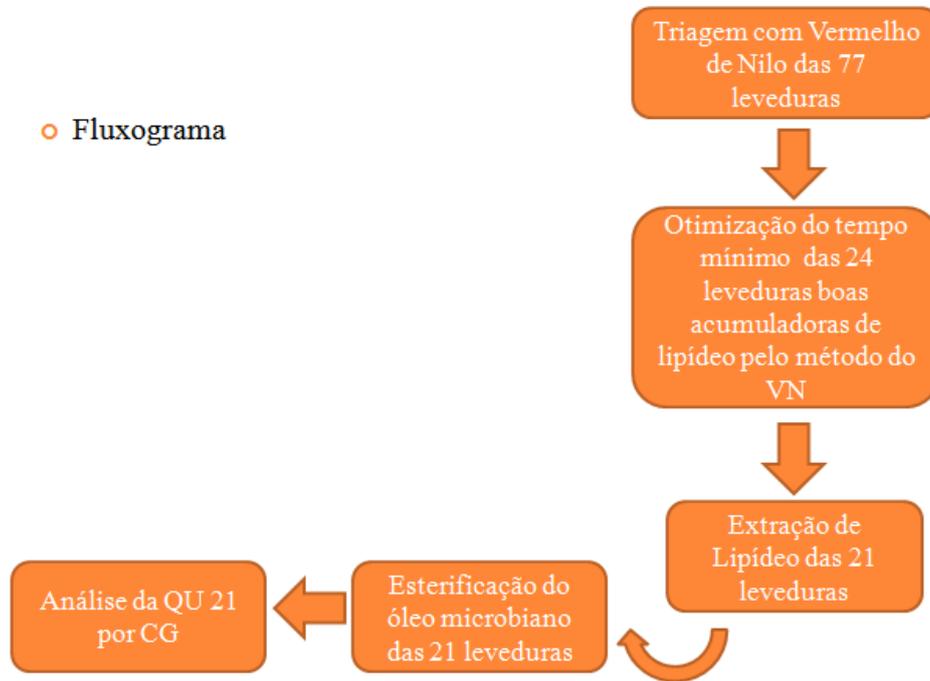


Figura 7: Fluxograma dos métodos empregados nos experimento com microrganismos.

3.1 Microrganismo

As leveduras foram obtidas de amostras do queijo artesanal (Landell M.F., et al. 2006) e foram testadas inicialmente 77 linhagens.

As cepas são mantidas em meio GYP (0,5% extrato de levedura, 1% peptona, 2% glicose, 2% Agar) com óleo mineral estéril em geladeira.

3.2 Condições de cultura

O experimento foi conduzido em frascos de Erlenmeyer com capacidade de 125 mL, contendo 50mL de meio A (10% Glicose, 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% KH_2PO_4 , 0,05% de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), contendo a razão C/N 100:1 Incubados em agitador horizontal a 150 rpm, durante 72 horas e temperatura de 25 °C. A contagem de células foi realizada utilizando Câmara de Neubauer em microscópio Zeiss HBO50 com a objetiva de 40x, com objetivo de padronizar o inóculo inicial, sendo usado 100 μL do inóculo no meio A em 1mL de água destilada. Foram utilizadas as seguintes condições de cultivo nos três experimentos independentes:

- a) Inicialmente, 77 cepas de leveduras foram cultivadas a temperatura ambiente por 72h durante o experimento da triagem (seleção) utilizando o agitador orbital.
- b) Do experimento anterior foram selecionadas 24 leveduras boas acumuladoras de lipídeo para otimização (tempo mínimo de acúmulo de lipídeo), utilizando o agitador orbital a temperatura ambiente por 24, 48h, e 72h.
- c) Vinte e uma cepas de leveduras boas acumuladoras de lipídeo foram cultivadas em estufa incubadora com agitação para extração de lipídeo utilizando temperatura controlada de 25 °C por 72h.

3.3 Avaliação do acúmulo de lipídeo em leveduras oleaginosas

Foram realizados esfregaços dos cultivos corados com vermelho de Nilo e as células foram observadas em microscópio de fluorescência, utilizando lentes com comprimento de onda abrangendo entre 450-500nm, com aumento de 100X. Nessas condições, os lipídios neutros (triglicerídeos) ficam corados de amarelo-ouro.

3.4 Extração de lipídeo

Os lipídios totais acumulados pelas linhagens testadas provindos do meio A com temperatura controlada nas 72h (condições de cultivo c) foram extraídos de acordo com Folch et. al. 1957, utilizando clorofórmio e metanol na proporção de 2:1 e papel filtro Macherey-Nagel (Papel Qualitativo MN615). Os frascos de falcon utilizados nesta etapa, contendo os lipídios e os solventes, foram incubados a 37°C para evaporação completa do solvente. Foi obtida a medida de peso seco da biomassa correspondente.

A primeira etapa foi o crescimento da levedura no meio Agar GYP (0,5% extrato de levedura, 1% peptona, 2% glicose, 2% Agar) inclinado, com incubação por 24h na estufa a 28 °C, com a finalidade de obtenção de células metabolicamente ativas para o momento do inóculo.

A segunda etapa é a inoculação no meio líquido, na qual é removido todo tapete de células do tubo de Agar inclinado e dissolvido completamente no Erlenmeyer com 50 mL de meio A, para posterior contagem de células na Câmara de Neubauer, sendo retirado uma alíquota de 100µL e adicionado ao tubo de ensaio contendo 1mL água.

As leituras da contagem de células foram realizadas no Microscópio Zeiss HBO50, utilizando a objetiva de 40x.

A terceira etapa foi colocar as amostras inoculadas no meio A em estufa incubadora submetidos a temperatura e rotação controlados por 3 dias.

A quarta etapa foi a extração de lipídeo pelo método baseado em Folch et. al. 1957, onde foram utilizados filtros com auxílio de bomba a vácuo, utilizando uma membrana filtrante de nitrocelulose.

Após a filtração do meio A foi coletado com alças de sementeiras descartáveis toda massa celular contida na membrana de nitrocelulose e transferida para um gral de porcelana. Foi adicionado nitrogênio líquido, e macerado delicadamente com o pistilo, tendo como objetivo facilitar o rompimento da parede celular.

Após essa etapa, o macerado resultante foi transferido para dentro de um tubo falcon de capacidade de 25mL (tubo cônico de plástico

cortado na altura de 15mL). O restante do macerado que ficava aderido às paredes do gral foi lavado com 1mL de solvente clorofórmio:metanol(2:1), diminuindo desta forma perda da amostra.

A quinta etapa foi a utilização do sonicador, para romper definitivamente a parede celular, e liberar todo o lipídeo presente na célula da levedura (Sonics & Materials inc./ Vibra in cell™). Foi utilizada a ponteira fina, amplitude de 25 a 40, potência de 9 a 13 output watts e foram realizados 10 ciclos de 30s com intervalo de 1min, resultando num procedimento de 15min por amostra em contato com 12 mL de clorofórmio:metanol(2:1). A cada amostra a ponteira foi higienizada com álcool 70%.

O lisado celular proveniente do sonicador foi filtrado com o papel filtro Macherey-Nagel (papel qualitativo MN615), ficando retido, a massa celular. O filtrado (óleo com solvente clorofórmio:metanol) recebeu um tratamento com 0,2 vezes com água do seu volume original, e foi submetido a agitação no vórtex por 30s. Após ficou duas horas no mínimo em repouso, separando, a fase oleosa da fase aquosa, a qual foi removida com auxílio de uma pipeta Pasteur.

A mistura solvente-lipídeos que passou pelo filtro foi coletada em novo tubo falcon. Os filtros foram colocados em placa de Petri de plástico e incubados a 29-30 °C junto com os falcon por sete dias para adquirirem peso constante, a fim de permitir o cálculo do rendimento de lipídeo.

3.4 Esterificação de lipídeo

A concentração de lipídeo total foi determinada por cromatografia gasosa por análise dos ácidos graxos totais a partir da transesterificação do filtrado pelo método de HARTMAN & LAGO - 1973, utilizando KOH 0,4M em metanol, H₂SO₄ 1M em metanol e n-hexano.

Adicionou-se ao tubo falcon contendo somente o óleo, o volume de 0,5 mL de KOH 0,4M em metanol; usando o tampa para manter o sistema

fechado, para assim, ser submetido a constante agitação no vortex, e após foi submetido em banho-maria a 100°C por 10 minutos. Verificado constantemente que o filtrado com solvente não evaporasse por completo no tempo de 15 min, e se necessário era adicionado mais 0,5 mL de KOH 0,4M em metanol.

Após essa etapa de resfriamento, foi adicionado o volume 1,5 mL de uma solução ácida de H₂SO₄ 1M em metanol; mantendo o sistema novamente fechado e sob agitação no vórtex, para homogenização e após foi submetido ao banho-maria a 100°C por mais 15 min, novamente não deixando secar a amostra e se preciso era adicionado mais 1,5 mL. Após ser resfriada a temperatura ambiente foi adicionado 2 mL de n-hexano grau cromatográfico, agitado no vórtex e deixado em repouso para separação das fases, coletando a fase SUPERIOR em Eppendorfs, previamente identificados e posteriormente selados com parafilme. As amostras foram mantidas congeladas até a injeção no cromatógrafo.

3.6 Análises por Cromatografia Gasosa

3.6.1. Cromatografia Gasosa (CG)

A cromatografia gasosa recebe este nome devido ao fato da fase móvel ser um gás, sendo utilizada para separação de substâncias gasosas ou volatilizáveis. A volatilização pode ser conseguida aumentando a temperatura no local de injeção da amostra e na coluna, ou derivando os compostos em outros, mais termicamente estáveis e apolares. A derivação é particularmente utilizada na CG para a determinação de substâncias de alta massa molecular e/ou contendo grupos funcionais fortemente polares, a fim de evitar sua decomposição. Nesse procedimento, ocorre a transformação da substância de interesse, em um derivado com características adequadas para ser analisado, ou ainda, introdução de grupos específicos aumentando a detectabilidade da substância (BANDEIRA, 2007).

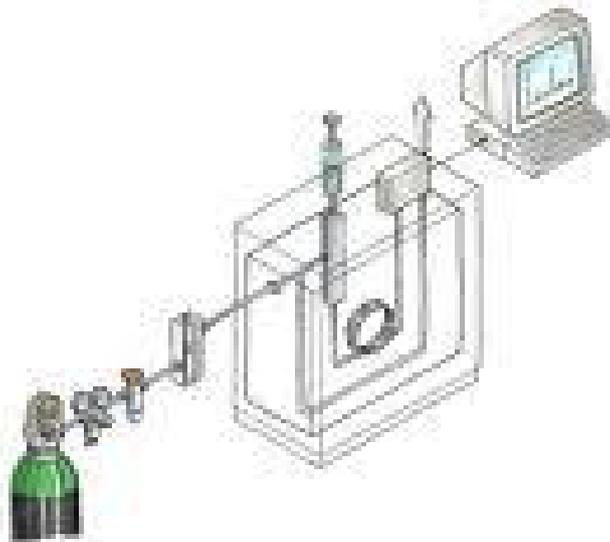


Figura 8: Esquema de um cromatógrafo gasoso (http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/relatorio_azeite_final.pdf) acessado: 05 de novembro de 2011.

3.6.2 Reagentes e Solventes

Os reagentes e solventes utilizados para preparação de soluções foram:

- Metanol, grau HPLC, Merck;
- Hexano, grau HPLC, Merck;
- Ácido sulfúrico, Vetec;
- Hidróxido de sódio, P.A., Synth;
- Água ultrapura (18.2 M Ω cm) obtida de um sistema Milli-Q de purificação

3.6.3 Padrões

- Supelco 37-Component FAME mix on the 75 m SP-2560 G003461 – aplicação para CG, sendo 37 ácidos graxos.
- Padrão interno: tetradecano

3.6.4 Coluna cromatográfica

Foi usada a coluna SLB IL 100 com detector FID, usando temperatura programada de 100 °C, aumentando 2 °C por min, até chegar a 200°C durante 30min.

3.5.5 Preparo das soluções padrão

Foram preparadas as soluções padrões para a curva padrão nas concentrações de 20mg/ml, 8mg/ml, 4mg/ml. A amostra de QU21 foi injetada na concentração para 1mL de volume. As soluções foram mantidas sob refrigeração a 4 °C.

4. Resultados

4.1 Avaliação do acúmulo de lipídeo em leveduras Oleaginosas

Todas as 77 linhagens de leveduras avaliadas apresentaram gotas lipídicas intracelulares, coradas com o corante vermelho de Nilo, no entanto, este acúmulo ocorreu em proporções diferentes em cada linhagem observada. Das amostras testadas, 45,45% apresentaram gotículas muito pequenas, 14,29% preencheram entre 50 e 80% do volume celular com gotas lipídicas e 40,26% das linhagens apresentaram uma única gota lipídica indicando preencher mais de 80% da célula como pode ser observado nas figuras 9 e 10.

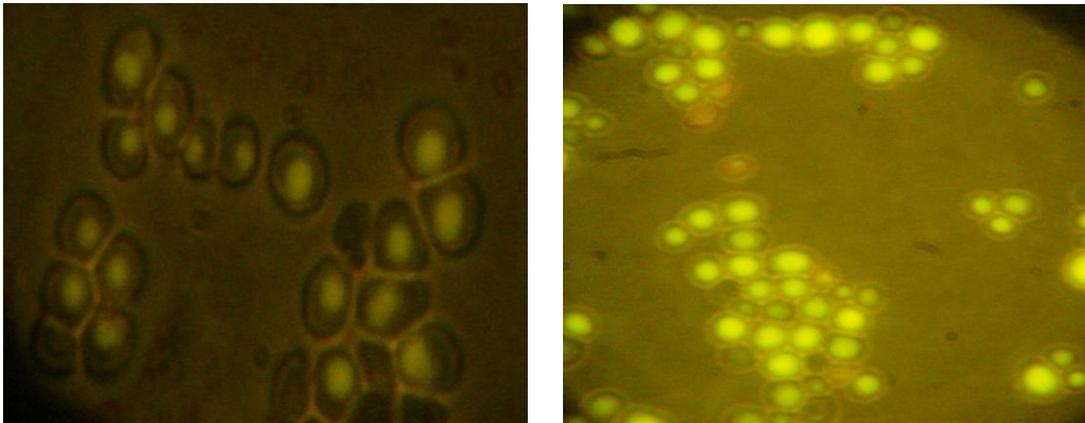


Figura 9: Linhagem de levedura observada em microscópio de fluorescência. Gotas lipídicas amarelo ouro indicam o acúmulo de óleo microbiano preenchendo entre 30 e 50% do seu volume celular na primeira imagem a esquerda, a direita indicam o acúmulo de óleo microbiano preenchendo mais de 80% do seu volume celular.



Figura 10: Representação gráfica do experimento do acúmulo de lipídeo analisado com o fluorocromo Vermelho de Nilo no tempo de 72h, sendo o eixo x % do volume da gota lipídica intracelular, enquanto o eixo y é a porcentagem das 77 leveduras avaliadas.

As leveduras que acumularam mais de 80% do volume celular em lipídeos foram selecionadas como boas produtoras de óleo microbiano e foram submetidas a um experimento para avaliar o tempo mínimo de acúmulo (24, 48 e 72h) sob agitação à temperatura ambiente, demonstrados na figura 10. Imagens de algumas linhagens representativas demonstram o aumento da quantidade de lipídeos com o passar do tempo (Figura 11).

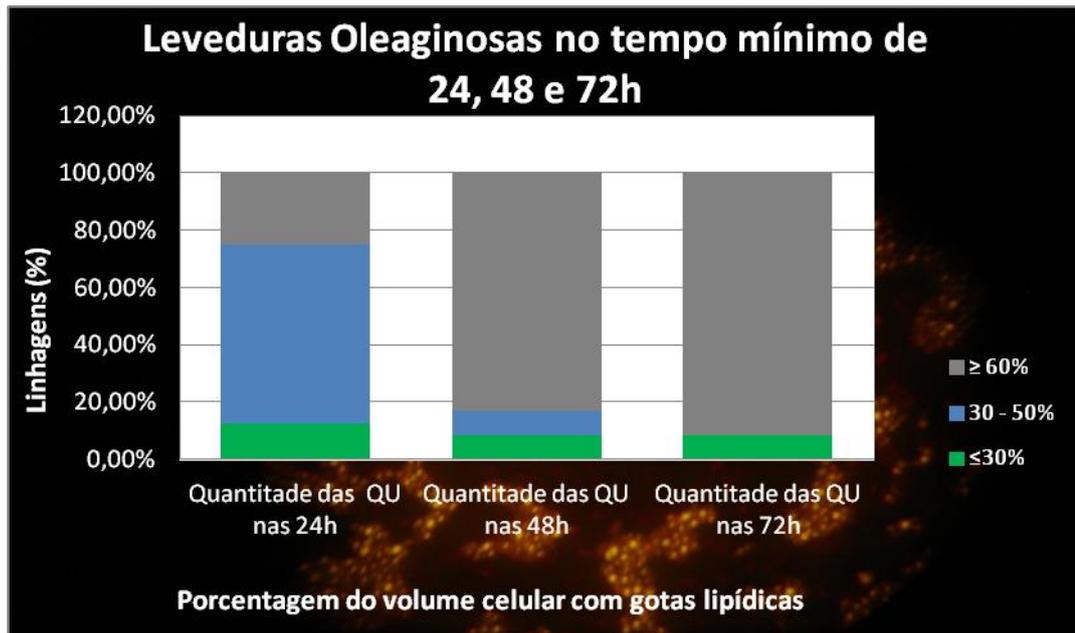


Figura 11: Representação gráfica do experimento do acúmulo de lipídeo analisado com o fluorocromo Vermelho de Nilo no tempo mínimo de 24h, 48h e 72h sendo o eixo x as 24 linhagens das leveduras oleaginosas isoladas do queijo, enquanto o eixo y é a porcentagem do volume da partícula lipídica dentro da célula da levedura.

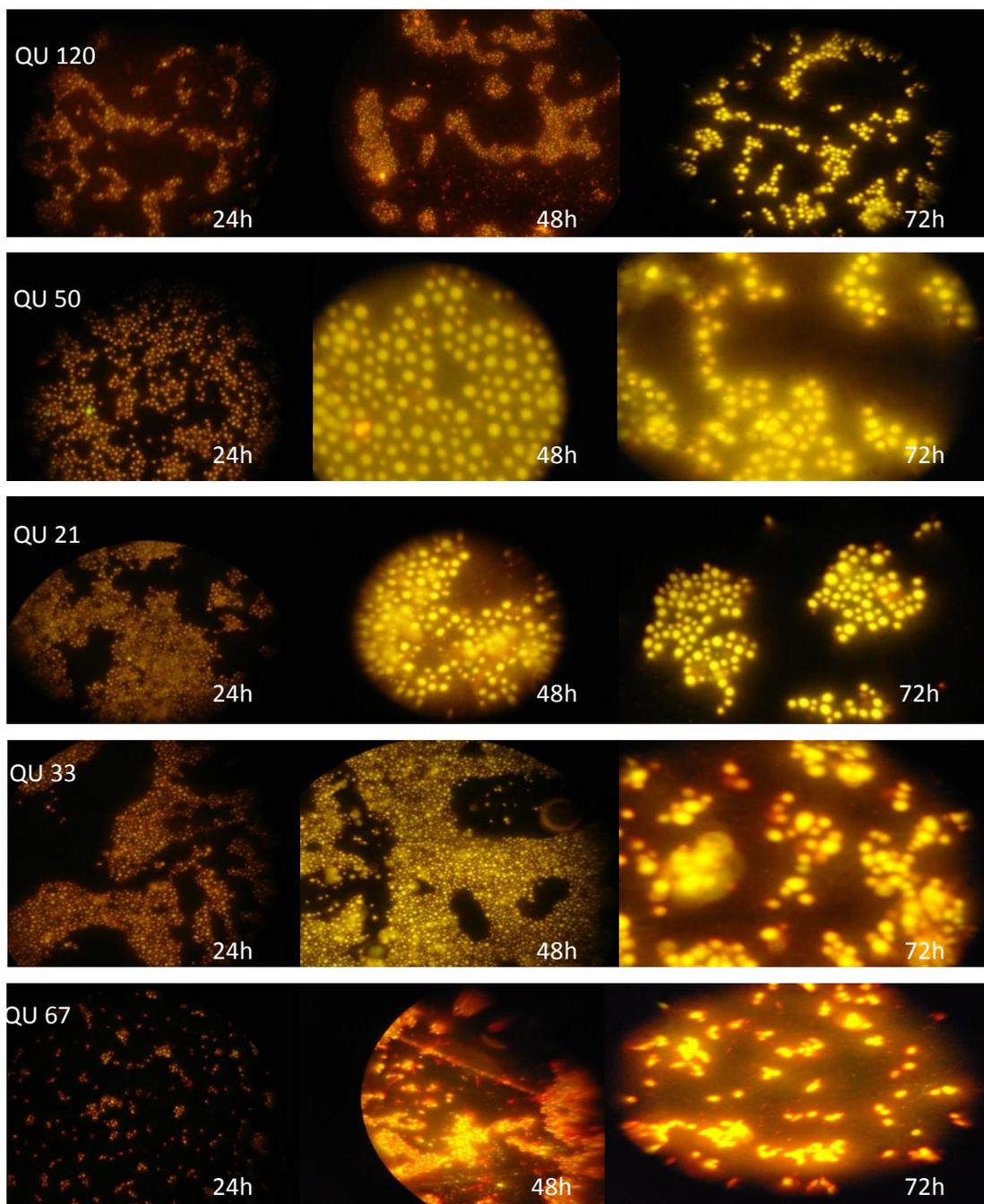


Figura 12: Leveduras oleaginosas observados por microscópio de fluorescência nos tempos de 24, 48 e 72h com as respectivas leveduras QU 120, 50, 21, 33 e 67.

4.2 Extração e análise de lipídeo

Tabela 1: Rendimento percentual em duplicata do lipídeo em biomassa seca.

Levedura	Rendimento 1(%)	Rendimento 2(%)
1QU 11	27,17	29,97
2QU 13	29,96	17,29
3QU 16	29,78	28,60
4QU 20	39,26	38,74
5QU 21	39,60	30,72
6QU 22	22,96	28,11
7QU 29	47,51	42,71
8QU 31	33,58	30,94
9QU 33	51,09	73,13
10QU 34	93,48	33,66
11QU 36	40,00	38,45
12QU 38	43,62	39,87
13QU 46	34,24	30,00
14QU 50	27,57	36,90
15QU 67	77,39	88,09
16QU 69	54,83	44,52
17QU 77	49,96	28,64
18QU 123	54,14	53,13
19QU 129	32,02	43,72
20QU 137	52,82	27,69
21QU 125	43,13	52,12

O rendimento percentual de lipídeos para cada linhagem avaliada pode ser visto na Tabela 1, enquanto que a comparação do número de células no inóculo se encontra na Tabela 2. Os dados absolutos de biomassa seca (g), do lipídeo (g), lipídios na biomassa (g / g), concentração de lipídios celulares (g/l) e concentração biomassa seca (g/ l) estão listados na Tabela 3.

Tabela 2: Número de célula do inóculo, com objetivo de verificar o crescimento das leveduras oleaginosas.

Levedura	Número de células (X10 ⁶)
1QU 11	9,09
2QU 13	3,18
3QU 16	1,49
4QU 20	2,90
5QU 21	3,09
6QU 22	3,15
7QU 29	1,63
8QU 31	6,33
9QU 33	3,95
10QU 34	1,27
11QU 36	3,85
12QU 38	4,30
13QU 46	1,11
14QU 50	11,00
15QU 67	3,77
16QU 69	3,94
17QU 77	2,24
18QU 123	5,40
19QU 129	4,06
20QU 137	7,70
21QU 125	1,15

Tabela 3 : Representação de biomassa seca (g), do lipídeo (g), lipídios na biomassa seca (g / g), concentração de lipídios celulares (g / l) e concentração de biomassa (g/L)

Levedura	Biomassa seca (g)	Lipídeo (g)	L/B (g/g)	[L] (g/l)	[B](g/l)
1QU 11	0,10	0,04	0,43	0,90	2,10
2QU 13	0,12	0,02	0,21	0,49	2,33
3QU 16	0,10	0,04	0,42	0,82	1,92
4QU 20	0,07	0,04	0,63	0,83	1,31
5QU 21	0,08	0,03	0,44	0,69	1,55
6QU 22	0,10	0,04	0,39	0,80	2,04
7QU 29	0,11	0,09	0,75	1,71	2,29
8QU 31	0,18	0,08	0,45	1,57	3,50
9QU 33	0,02	0,05	2,72	1,02	0,37
10QU 34	0,10	0,05	0,51	1,03	2,02
11QU 36	0,11	0,07	0,62	1,43	2,30
12QU 38	0,13	0,09	0,66	1,70	2,56
13QU 46	0,14	0,02	0,16	0,45	2,78
14QU 50	0,11	0,07	0,58	1,33	2,28
15QU 67	0,01	0,07	7,39	1,45	0,20
16QU 69	0,06	0,05	0,80	0,93	1,15
17QU 77	0,12	0,05	0,40	0,94	2,33
18QU 123	0,08	0,09	1,13	1,75	1,54
19QU 129	0,08	0,06	0,78	1,26	1,62
21QU 125	0,16	0,06	0,38	1,24	3,24
20QU 137	0,07	0,07	1,09	1,45	1,33

Tabela 4: Representação de biomassa seca por grama de glicose do meio A (X/Glic, g/g), do lipídeo (Y/Glic, g/g)

Levedura	X/Glic (g/g)	Y/Glic (g/g)
1QU 11	0,02	0,009
2QU 13	0,02	0,005
3QU 16	0,02	0,008
4QU 20	0,01	0,008
5QU 21	0,01	0,007
6QU 22	0,02	0,008
7QU 29	0,02	0,017
8QU 31	0,04	0,016
9QU 33	0,00	0,010
10QU 34	0,02	0,010
11QU 36	0,02	0,014
12QU 38	0,03	0,017
13QU 46	0,03	0,005
14QU 50	0,02	0,013
15QU 67	0,00	0,015
16QU 69	0,01	0,009
17QU 77	0,02	0,009
18QU 123	0,02	0,017
19QU 129	0,02	0,013
21QU 125	0,03	0,012
20QU 137	0,01	0,015

A Tabela 4 apresenta uma estimativa da quantidade de óleo que seria obtida com a utilização de 100g de glicose para cada linhagem avaliada, considerando-se que o rendimento seria proporcional aos obtidos nos experimentos realizados no presente trabalho.

No presente estudo, a levedura QU 21 obteve um rendimento lipídico em relação ao seu peso seco de $35,16 \pm 6,28\%$ e teve perfil lipídico composto por C18:1 (ác. oléico), C16:0 (ác. palmítico), C18:0 (ác. esteárico), C16:1 (ác. palmitoléico), C17:1 (ác. heptadecanóico), C14:1 (ác. miristoléico) e C14:0 (ác. mirístico). Os resultados obtidos sugerem que essa levedura é uma boa candidata para produção de biodiesel, já que possui grande quantidade de ácidos graxos saturados e de longas cadeias.

5. Discussão

Mortierella isabellina apresenta a mesma composição de ácidos graxos para as duas fontes de C testadas, tanto para glicose quanto para o glicerol (16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:3, 20:4), mostrando-se diferente da composição lipídica da QU21, mesmo sendo utilizada glicose como fontes de C e, sulfato de amônio como fonte de N. No experimento da *M. isabellina* foram testadas diferentes razões de C/N, utilizando no mínimo de 150:1, e no máximo de 340:1, o que não demonstrou diferença significativa na razão lipídeo/biomassa. No entanto mostrou vantagem no acúmulo de lipídeo o aumento da razão C/N. Enquanto nas leveduras oleaginosas QU utilizamos a razão 100:1 e obtivemos linhagens com valores tanto inferiores como superiores aos 0,55 g/L de lipídeo da *M. Isabelina* (Hou, 2008). Portanto, a razão ideal de C/N para acúmulo de lipídeos é dependente da linhagem do microrganismo avaliada. Nos resultados inferiores encontrados na produção de lipídeo do experimento da QU possivelmente esteja relacionado à razão C/N, ou por não ter sido usado duas fontes diferentes de N, como sulfato de amônio e extrato de levedura ou pela a oxigenação do frasco, que tem a metade da capacidade da *M. isabellina*.

Em outro trabalho com *Mortierella isabellina* cultivada com as mesmas fontes de C e N que do experimento das leveduras QU, foi acumulado lipídeo no interior do micélio fúngico (50-55%, wt / wt de óleo em biomassa seca) após a depleção total de nitrogênio. Comparando com nossos resultados, obtivemos valores absolutos maiores em relação ao rendimento, chegando até a 82,74% de média de óleo em biomassa seca. No entanto em relação a produção de óleo, a *M. Isabelina* apresentou concentração de lipídeo de 18,1g/L (Papanikolaou et al, 2004), valor superior aos da QU (1,75g/L de óleo em meio A), podendo estar relacionado ao uso de outros sais, cofatores, que devem ser essenciais para as enzimas das rotas se síntese de lipídeo. Também

apresentaram valor de biomassa seca total de 0,34g por g de glicose e de lipídios 0,17 g por g de glicose consumida. Enquanto que o rendimento das leveduras QU foi de 0,04 g de biomassa seca total por g de glicose e de lipídios 0,017 g por g de glicose consumida.

Em um dos testes com *Candida* (Hall&Ratledge,1977) usando glicose como fonte de C foi obtido biomassa na concentração de 4,6g/l, sendo praticamente superior em uma grama a mais do que das leveduras oleaginosas. E o valor de biomassa em 100g de glicose foi de 46,4 g, sendo 13,26 vezes maior que o nosso valor máximo de biomassa a partir de 100g de glicose. E de lipídeo em 100g de glicose foi de 4,3g, também superior ao nosso em 2,46 vezes. Porém o rendimento de lipídeo em biomassa foi de 9,4%, sendo inferior aos nossos valores, provavelmente por terem obtido maior quantidade de biomassa seca. As leveduras QU também obtiveram melhor valor na concentração de lipídeo total, sendo 4,07 vezes superior a *Candida*, que obteve 0,43g/l de lipídeo.

Tabela 5: Rendimento em % dos óleos das microalgas adaptado de Y. Christi, 2007.

Microalga	Oil content (% dry wt)
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75
<i>Chlorella</i> sp.	28–32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16–37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25–33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris</i> sp.	20–35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31–68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35–54
<i>Nitzschia</i> sp.	45–47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20–30
<i>Schizochytrium</i> sp.	50–77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15–23

Fonte: Y. Chisti / *Biotechnology Advances* 25 (2007) 294–306

Tabela 6: Produção de lípideo por vários microrganismos oleaginosos

Cepa	Fonte de C	Composição de ácidos Graxos	Referência
<i>Candida(107)</i>	Glicose	12:0, 14:0, 16:0, 16:1, 18:0, 18:2	Hall e Ratledge, 1977
<i>Chlorella</i>	Glicose	14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 18:2, 18:1, 10:0, 20:1	Xiong et al., 2008
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Lodo de Esgoto	14:0, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2,18:3,20:0, 20:1, 22:0	Augerbauer et al., 2008
<i>Mortierella</i>	Glicose e glicerol	16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:3, 20:4	Hou, 2008
<i>Mortierella isabellina</i>	Glicose	18:3	Papanikolaou et al., 2004
<i>Y. lipolytica</i>	Estearina e Glicerol	12:0, 14:0, 16:0	Papanikolaou et al., 2002
<i>Trichosporon fermentans</i>	Glicose	14:0, 16:0, 18:1, 18:2	Zhu, 2008

Na tabela 1, o rendimento mínimo da duplicata é de 23,63% e o máximo de 82,74%, demonstrando que quase todas as linhagens de leveduras avaliadas apresentam valores semelhantes ao rendimento de lípideo em relação a biomassa seca comparado com as microalgas (Tabela 5). Sendo que as nossas condições de cultivo ainda não foram otimizadas para a produção de óleo microbiano, já que este trabalho teve

por objetivo apenas a seleção das linhagens de leveduras capazes de acumular óleo, existe a possibilidade de futuro aumento do rendimento em óleo das nossas leveduras.

No presente estudo, a levedura QU 21 demonstrou ter um perfil lipídico composto por alguns ácidos graxos iguais ao microbiodiesel da alga heterotrófica *Chlorella* (Xiong et al., 2008), como: C14:0 (ác. mirístico), C16:0 (ác. palmítico), C18:1 (ác. oléico), C18:0 (ác. esteárico), e também outros diferentes como: C16:1 (ác. palmitoléico), C17:1 (ác. heptadecanóico), C14:1 (ác. miristoléico).

Como existem grandes preocupações com resíduos industriais por causa da saúde humana e do meio ambiente (solo, água, ar e paisagens). Existem em prol disso, diversas pesquisas para aplicabilidade desses resíduos, e entre esses foi testado a partir de lodo de esgoto como fonte de C o quanto cepa *Lipomyces starkeyi* poderia aproveitar desse nutriente para acumular ácidos graxos para fins industriais. E desse foi acumulado os seguintes ácidos graxos: ácido mirístico C14:0, ácido linolênico C18:3, ácido palmítico C16:0, ácido araquídico C20:0, ácido palmitoléico C16:1, ácido gadoléico C20:1, ácido esteárico C18:0, Behenic C22:0, Ácido oléico C18:1, Ácido linoléico C18:2 (Angerbauer.et.al.,2008).

Quando utilizado estearina como fonte de C em *Yarrowia lipolytica* observou-se que os ácidos graxos de C12:0, C14:0 e C16:0 foram mais rapidamente incorporadas intracelularmente e, principalmente, usados para as necessidades de crescimento, enquanto C18:0 foi incorporada com taxas reduzidas e foi acumulada principalmente como material de armazenamento. Quando foi utilizado o glicerol industrial como co-substrato, juntamente com estearina, a concentração de ácido graxo insaturado na reserva lipídica aumentou (Papanikolaou, 2002). Isso demonstra a grande especificidade que cada microrganismo apresenta no seu metabolismo, deixando perspectivas para futuros estudos.

O acúmulo de lipídios por *Yarrowia lipolytica* com gordura industrial obtido foi de 0,44-0,54 g de lipídios por biomassa (g) (Papanikolaou, 2002). No presente trabalho encontrou-se linhagem com valores de 7,39 g de lipídios por grama de biomassa, valor esperado já que não trabalhamos com resíduos de gordura industrial. Mesmo assim podemos ter um microrganismo mais promissor ao acúmulo de lipídeo. Eles utilizaram o meio com pH 6 e temperatura de 28-33 ° C, e produziram 9-12 g/L de biomassa seca, sendo superior aos valores da concentração de biomassa (g/L) do presente trabalho, o qual não mantivemos o pH controlado. Mas foi feita a medição do pH no inóculo após os 3 dias de agitação em agitador orbital e o valor encontrado foi de pH 2. Sabemos que o pH ideal para o cultivo é de 6, desta forma realizaremos os próximos experimentos para controlar acidez do meio, contribuindo desta forma para a maior sobrevivência do microrganismo afim de aumentar o acúmulo de lipídeo.

6. Conclusão

1. Foi feita a triagem das leveduras oleaginosas a partir da coleção de leveduras isoladas de queijo artesanal no Rio Grande do Sul, Brasil, e com isso foram selecionadas leveduras boas produtoras de óleo microbiano.
2. Os resultados obtidos do rendimento de lipídeos produzidos pelas leveduras oleaginosas em meio contendo razão C:N 100:1, usando glicose como fonte de carbono foram satisfatórios, pois teve linhagens com rendimento de 88,09%, sendo superiores ao rendimento encontrado na literatura, obtivemos 3 linhagens que acumulam mais de 60% de óleo em peso seco. Porém é necessário testar as condições ótimas de cultura.
3. Os lipídeos produzidos por uma levedura oleaginosa (QU 21) foram caracterizados através de cromatografia gasosa, apresentando ácidos graxos com cadeias longas e saturadas, que podem possuir aplicabilidade em biodiesel. Outra aplicação pode ser como alimento funcional, devido aos ácidos graxos insaturados.

Como perspectiva, pretendemos caracterizar o perfil lipídico das melhores cepas de leveduras oleaginosas, visando o aproveitamento deste material para sua bioconversão em bioprodutos de alto valor agregado e definir sua melhor aplicação biotecnológica.

7. Referências

Assy, N., Nassar, F., Nasser, G., Grosovsky, M. **Review: Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease.** World J Gastroenterol. V. 15, n.15, p. 1809-1815, 2009.

Angerbauer, C., M. Siebenhofer, M. Mittelbach, and G. M. Guebitz. **Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production.** Bioresource Technology. V. 99, p. 3051-3056, 2008.

Bandeira, Célilia Muller. **Desenvolvimento e validação de um método para determinação de colesterol em farinha de carne e osso em mistura de alimentos para ruminantes e utilizando cromatografia gasosa.** 27f. Tese (Dissertação de Mestrado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária portaria nº 398, de 30 de abril de 1999 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde no Brasil Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília, 1999.

Brasil. Ministério da Saúde. Do programa Saúde Brasil Coletiva 2009, disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/SAUDE_BRASIL_2009_COLETIVA.pdf. Acesso em: 05 nov. 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Plano de ações estratégicas para o enfretamento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2020. Disponível em Saúde Brasil 2011 do MS http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/cartilha_dcnt_completa_portugues.pdf. Acesso em: 05 nov. 2011.

Angerbauer, C., M. Siebenhofer, M. Mittelbach, and G. M. Guebitz. **Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production.** Bioresource Technology. V. 99, p.3051-3056, 2008.

Canakci M., Sanli H. **Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties.** J Ind Microbiol Biotechnol. Journal of industrial microbiology biotechnology. V. 35, n.5, p. 431-441, 2008.

Chisti Y. **Biodiesel from microalgae beats bioethanol.** Biotechnol. Adv. 25.. Trends in Biotechnology. V.26, n.3, p.294-306, 2007.

Clément, M., Tremblay, J., Lange, M., Thibodeau, J. and Belhumeur, P. **Purification and identification of bovine cheese whey fatty acids exhibiting in vitro antifungal activity.** Journal of Dairy Science. V.91, p.2535-2544, 2008.

Danaei G. , Ding E. L. , Mozaffarian D. , Taylor B. , Rehm J. , Murray C. J. , Ezzati M. **The Preventable Causes of Death in the United States: Comparative Risk Assessment of Dietary, Lifestyle, and Metabolic Risk Factors.** PLoS Medicine. V. 6, n. 4, 2009.

Desbois A. P. , Smith V. J. **Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential.** Applied Microbiology and Biotechnology. Volume 85, N. 6, p.1629-1642, 2010.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. **A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.** J. Biol. Chem. Boston, Massachusetts N. 226, p. 497-509, 1957.

Gema H., Kavadia A., Dimou D., Tsagou V., Komaitis M. Aggelis G. **Production of γ -linolenic acid by *Cunninghamella echinulata* cultivated on glucose and orange peels.** Appl. Microbiol. Biotechnol. V. 58, p. 303-307, 2002.

Geris R., Santos N., Amaral B., Maia I., Castro, V., Carvalho J., **Reação de Transesterificação para Aulas Práticas de Química Orgânica.** Química Nova, Salvador – BA, vol. 30, Nº05. 1369-1373, 2007.

Hall M.J. & Ratledge C. **Lipid Accumulation in an Oleaginous Yeast (*Candida 107*) Growing on Glucose Under Various Conditions in a One- and Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures** (2002). Appl. Microbiol. Biotechnol. n.58, p. 308-312, 2001.

Hartman L., Lago R.C.A. **Rapid preparation of fatty acids methyl esters.** Lab. Pract., London. V. 22, p. 475–476, 1973.

Hou C.T. **Production of arachidonic acid and dihomo- ω -linolenic acid from glycerol by oil-producing filamentous fungi, *Mortierella* in the ARS culture collection.** USA. J Ind Microbiol Biotechnol n. 35, p. 501–506, 2008.

Huang CB, Altimova Y, Myers TM, Ebersole JL. **Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms.** Archives of Oral Biology. Lexington, KY, USA, V. 56, n. 7, p. 650-654, 2011.

Huang CB, Ebersole JL. **A novel bioactivity of omega-3 polyunsaturated fatty acids and their ester derivatives.** Molecular Oral Microbiology. Lexington, KY, USA. V.25, n. 1, p. 75–80, 2010.

Huang CB, George B, Ebersole JL. **Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms** *Archives of Oral Biology*. Lexington, KY, USA. V. 55, n. 8, p. 555-560, 2010.

Hungenholtz J, Smid EJ. **Nutraceutical production with food-grade microorganisms**. *Curr Opin Biotechnol*. V. 13, p. 497-50, 2002.

Jang, H. D., Lin, Y. Y. and Yang, S. S. **Polyunsaturated Fatty Acids Production by *Mortierella alpina***. *Bioresource Technology*. Taiwan .V. 96, n. 15, p. 1633-1644, 2005.

Julius, U. **Influence of Plasma Free Fatty Acids on Lipoprotein Synthesis and Diabetic Dyslipidemia**. Dresden, Germany. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. V.111, n.5, p. 246-25, 2003.

Koike Y., Cai H. J., Higashiyama K., Fujikawa S., Enoch Y. Park, **Effect of consumed carbon to nitrogen source ratio on mycelial morphology and arachidonic acid production in culture of *Motierella alpina***, *J. Biosci. Bioeng.*, V. 91, n.4, p. 382-389, 2001.

KWAK, N.; JUKES, D. J. **Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept**. *Food Control*. V. 12, p.99-107, 2001a.

Landell M.F., Hartfelder C. & Valente P. **Identification and enzymatic profile of yeasts isolated from artisanal cheese in Southern Brazil**. Rio Grande do Sul. *Acta Scientiae Veterinariae*. N. 34, p.49-55, 2005.

Levison ME. **Effect of Colon Flora and Short-Chain Fatty Acids on Growth In Vitro of *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriaceae**. *INFECTION AND IMMUNIT*, Philadelphia, Pennsylvania. V. 8, n. 1, p. 30-35, 1973.

Li Y, Horsman M, Wu N, Lan CQ, Dubois-Calero N. **ARTICLES: BIOCATALYSTS AND BIOREACTOR DESIGN.** Biotechnol. Prog. China & Canadá. V. 24, n. 4, p. 815-820, 2008.

Liu S, Ruan W, Li J, Xu H, Wang J, Gao Y, Wang J. **Biological Control of Phytopathogenic Fungi by Fatty Acid Biological Control of Phytopathogenic.** Fungi by Fatty Acid Mycopathologia. V. 166, n. 2, p. 93-102, 2008.

Meka P.K., Tripathi V., Singh R. P. **Synthesis of Biodiesel Fuel from Safflower Oil Using Various Reaction Parameters.** Kanpur, India. Journal of Oleo Science. V. 56, n. 1, p. 9-12. 2007.

Miller R.D., Brown K.E., Morse S.A. **Inhibitory Action of Fatty Acids on the Growth of Neisseria gonorrhoeae.** Infect Immun. Oregon; V.17, n. 2, p. 303–312, 1977.

Moraes P. & Colla M. **Alimentos Funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde.** Revista Eletrônica de Farmácia. V. 3, n.2, p.109-122, 2006.

Nobmann P., Smith A., Dunne J., Henahan G., Bourke P. **The antimicrobial efficacy and structure activity relationship of novel carbohydrate fatty acid derivatives against *Listeria* spp. and food spoilage microorganisms.** Ireland. International Journal of Food Microbiology. V. 128, n. 3, p. 440-445, 2009.

Papanikolaou S., Galiotou-Panayotou M., Chevalot I., Komaitis M., Marc I., Aggelis G. **Influence of glucose and saturated free-fatty acid mixtures on citric acid and lipid production by *Yarrowia lipolytica*.** Current Microbiology. V. 52, n. 2, p. 134-142, 2006.

Papanikolaou S., Chevalot I., Komaitis M., Aggelis G. & Marc I. **Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats.** *Antonie van Leeuwenhoek* n. 80, p.215–224, 2001.

Papanikolaou S., Galiotou-Panayotou M., Chevalot I., Komaitis M., Aggelis G. & Marc I. **Influence of Glucose and Saturated Free-Fatty Acid Mixtures on Citric Acid and Lipid Production by *Yarrowia lipolytica*.** *Current Microbiology* V. 52, p. 134–142, 2005.

Papanikolaou S., Komaitis M. & Aggelis G. **Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high sugar content media.** *Bioresource Technol.* V.95, p.287-291, 2004.

Papanikolaou S., L. Muniglia, I. Chevalot, G. Aggelis & I. Marc. **Accumulation of a Cocoa-Butter-Like Lipid by *Yarrowia lipolytica* Cultivated on Agro-Industrial Residues.** *Current Microbiology*. V. 46, p. 124–130, 2003.

Parente EJS. **Biodiesel: Uma Aventura Tecnológica num País Engraçado.** Ed. Unigráfica: Fortaleza, Brasil, 2003.

Petschow BW, Batema RP, Ford LL. **Susceptibility of *Helicobacter pylori* to bactericidal properties of medium-chain monoglycerides and free-fatty acids.** *Antimicrob Agents Chemother* V.40, p. 302-306, 1996.

Pousa GPAG, Santos ALF, Suarez PAZ. **History and policy of biodiesel in Brazil.** *Energy Policy*. Brasília-DF, Brazil. V. 35, n. 11, p.5393-5398, 2007.

Ratledge, C.. **Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production.** Short survey *Biochimie*. V.86, n. 11, p. 807-815, 2004.

Sheu CW, Freese E. **Lipopolysaccharide Layer Protection of Gram-Negative Bacteria Against Inhibition by Long-Chain Fatty Acids.** JOURNAL OF BACTERIOLOGY, USA, V. 115, n. 3, p. 869-875, 1997.

Skřivanová E., Marounek M., Dlouhá G., Kaňka J. Susceptibility of ***Clostridium perfringens*** to **C2 - C18 fatty acids.** Lett. Appl. Microbiol. V.41, p.77 - 81, 2005.

Smith VJ, Desbois AP, Dyrinda EA. **Conventional and Unconventional Antimicrobials from Fish, Marine Invertebrates and Micro-algae.** Marine Drugs, Scotland, UK. V. 8, p. 1213-1262, 2010.

Souza, P. H. M.; Souza Neto, M. H.; Maia, G. A. **Componentes funcionais nos alimentos.** Boletim da SBCTA. V. 37, n. 2, p. 127-135, 2003.

Suarez P., Meneghetti S., Meneghetti M. **Transformação de triglicerídeos em combustíveis materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica.** *Quim. Nova*, V. 30, n. 3, p. 667-676, 2007.

Timbermont L, Lanckriet A, Dewulf J, Nollet N, Schwarzer K, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F. **Control of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broilers by target-released butyric acid, fatty acids and essential oils.** *Avian Pathol.* V. 39, n.2, p.117-21, 2010.

Tortora, G. J. ; Funke , B. R. ; Case, C. L. Microbiologia. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000, p. 96.

Wille J. J., Kydonieus A. **Palmitoleic Acid Isomer (C16:1Δ6) in Human Skin Sebum Is Effective against Gram-Positive Bacteria.** Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology; USA. V. 16, n. 3, p.176-187, 2003.

Zhu L.Y., Zong M.H., Wu H.. **Efficient lipid production with Trichosporon fermentans and its use for biodiesel preparation.** Bioresource Technology, China, n.99, p. 7881–7885, 2008.