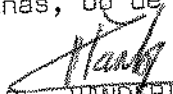


**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**CARACTERIZAÇÃO DE MUCORALES (ZIGOMICETOS)
ATRAVÉS DE ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por MANUELA DA SILVA e aprovada pela Comissão Julgadora em 06.12.96. Campinas, 06 de dezembro de 1996


Prof. Dr. VANDERLEI PEREZ CANHOS
Presidente da Banca

**Manuela da Silva
Bacharel em Biologia**

**Prof. Dr. Vanderlei P. Canhos
Orientador**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos exigidos para obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas - SP
1996



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

SI38c Silva, Manuela da
Caracterização de Mucorales (Zigomicetos) através de análise de
ácidos graxos / Manuela da Silva. -- Campinas, SP: [s.n.], 1996.

Orientador: Vanderlei Perez Canhos
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Fungos. 2.Quimiotaxonomia. 3.Ácidos graxos. I.Canhos,
Vanderlei Perez. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade
de Engenharia de Alimentos. III.Título.

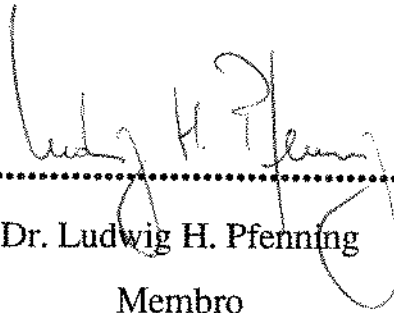
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Vanderlei P. Canhos
Orientador



Profa. Dra. Hélia H. Sato
Membro



Dr. Ludwig H. Pfenning
Membro

Profa. Dra. Lucia R. Durrant
Suplente

Campinas, de de 1996

*"Amigo é coisa para se guardar no lado esquerdo do peito
Mesmo que o tempo e a distância digam não
Mesmo esquecendo a canção
O que importa é ouvir a voz que vem do coração
Pois seja o que vier
Venha o que vier
Qualquer dia amigo eu volto a te encontrar
Qualquer dia amigo agente vai se encontrar..."*

Canção da América, Milton Nascimento

*Aos meus pais e meu irmão por todo apoio e carinho e
aos meus grandes amigos pela amizade*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Vanderlei P. Canhos, antes de tudo, pela confiança depositada em mim no início do meu ingresso na Fundação Tropical, da qual é diretor, e por todo o apoio e infra-estrutura colocada à minha disposição para a produção desta.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos pelo curso de Mestrado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao amigo muito especial e co-orientador, Ludwig H. Pfenning, a quem admiro muito e devo não somente o conhecimento científico adquirido durante o Mestrado, mas também os ensinamentos de uma amizade, respeito e compreensão.

Ao amigo e co-orientador, Gilson P. Manfio, pelo bom humor e disposição durante a orientação na fase final do trabalho. À Valéria, à Cathia e à Sandra pelas revisões desta, além da amizade.

À professora Dra. Lucía R. Durrant pelas sugestões e auxílio dados com muita simpatia ao longo do trabalho no Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana.

À professora Dra. Délia B. Rodriguez-Amaya pelos ensinamentos e sugestões dados em relação à cromatografia gás-líquida.

À professora Dra. Hélia H. Sato pela correção do boneco e pela participação como membro da banca examinadora.

Aos funcionários, estagiários e bolsistas da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello” pelo apoio e amizade demonstrados.

A todos do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana presentes durante o período em que estive lá pelos bons momentos de convivência, e principalmente à Daniela, técnica do laboratório, e à Tânia pelo apoio e conhecimentos recebidos.

A todos os meus amigos à quem devo muitos momentos especiais que compartilhamos e que ficarão guardados em minha memória, os quais espero sinceramente que se repitam, “mesmo que o tempo e a distância digam não...”.

ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. LIPÍDIOS E ÁCIDOS GRAXOS.....	4
3.1.1. Lipídios	4
3.1.2. Ácidos Graxos.....	5
3.2. ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS	8
3.3. CONDIÇÕES PARA UTILIZAÇÃO QUIMIOTAXONÔMICA DE ÁCIDOS GRAXOS	10
3.4. ÁCIDOS GRAXOS NA QUIMIOTAXONOMIA DE FUNGOS	11
3.5. FUNGOS DA ORDEM MUCORALES.....	15
3.5.1. <i>Mucor circinelloides</i> f. <i>janssenii</i> (Lendner) Schipper	15
3.5.2. <i>Backusella lamprospora</i> (Lendner) Benny & R.K. Benj.....	17
3.5.3. <i>Circinella simplex</i> van Tieghem.....	17
3.5.4. <i>Rhizomucor miehei</i> (Cooney & R. Emerson) Schipper.....	19
3.5.5. <i>Rhizomucor pusillus</i> (Lindt) Schipper.....	20
3.5.6. <i>Mortierella ramanniana</i> (Möller) Linnem.....	21
3.5.7. <i>Benjaminiella youngii</i> P.M. Kirk.....	23
3.5.8. <i>Mycotypha microspora</i> Fenner	24
3.5.9. <i>Cunninghamella blakesleeana</i> Lendner	24
3.5.10. <i>Volutella</i> Fr.....	26

4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1. CULTURAS DE MICRORGANISMOS	27
4.2. METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS.....	28
4.2.1. Cultivo dos Fungos Filamentosos e Preparação de Biomassa	29
4.2.2. Reagentes, Extração e Derivatização dos Ácidos Graxos	31
4.2.3. Análise Cromatográfica dos FAMES.....	33
4.2.4. Análise de Dados.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1. EXTRAÇÕES DE ÁCIDOS GRAXOS	36
5.2. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE FAMES.....	36
5.2.1. <i>Mucor circinelloides</i> f. <i>janssenii</i> CCT 4396	38
5.2.2. <i>Backusella lamprospora</i> CCT 3480.....	39
5.2.3. <i>Circinella simplex</i> CCT 4260	40
5.2.4. <i>Rhizomucor miehei</i> CCT 2236.....	40
5.2.5. <i>Rhizomucor pusillus</i> CCT 4133.....	41
5.2.6. <i>Mortierella ramanniana</i> CCT 4428.....	43
5.2.7. <i>Benjaminiella youngii</i> CCT 4121	45
5.2.8. <i>Mycotypha microspora</i> CCT 4126 e CCT 4127.....	45
5.2.9. <i>Cunninghamella blakesleeana</i> CCT 4123.....	47
5.2.10. <i>Volutella</i> sp. CCT 2995.....	49
5.3. CLASSIFICAÇÃO QUIMIOTAXONÔMICA DOS FUNGOS ANALISADOS	50
6. CONCLUSÃO.....	56
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	58

ÍNDICE DE TABELA

	Página
Tabela 1. Alguns ácidos graxos saturados de cadeia linear.	7
Tabela 2. Alguns ácidos graxos insaturados de cadeia linear.	7
Tabela 3. Linhagens de fungos utilizadas para a extração de ácidos graxos.	27
Tabela 4. Padrão de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES)	28
Tabela 5. Meio de cultura utilizado para preservação dos fungos.	29
Tabela 6. Meios de cultura utilizados para o crescimento dos fungos	29
Tabela 7. Condições cromatográficas utilizadas para a análise dos FAMES extraídos dos fungos estudados	34
Tabela 8. Datas de extração e análise cromatográfica dos FAMES de fungos.	36
Tabela 9. Ácidos graxos identificados e não identificados com a variação correspondente dos seus tempos de retenção	37
Tabela 10. Perfil qualitativo de ácidos graxos dos fungos estudados.	52
Tabela 11. Proporções relativas médias (%) dos ácidos graxos dos fungos estudados.	53

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Três ácidos graxos comuns, mostrandos na fórmula estrutural.....	6
Figura 2. Via biossintética de ácidos graxos insaturados em microrganismos	9
Figura 3. <i>Mucor circinelloides</i> f. <i>janssenii</i> CBS 205.68	16
Figura 4. <i>Backusella lamprospora</i>	18
Figura 5. <i>Circinella simplex</i>	19
Figura 6. <i>Rhizomucor miehei</i> CBS 182.67.....	20
Figura 7. <i>Rhizomucor pusillus</i> CBS 354.68.....	21
Figura 8. <i>Mortierella ramanniana</i> var. <i>ramanniana</i> CBS 219.47	22
Figura 9. <i>Benjaminiella youngii</i> IMI 325629	23
Figura 10. <i>Mycotypha microspora</i>	25
Figura 11. <i>Cunninghamella blakesleeana</i>	26
Figura 12. <i>Volutella</i> sp.....	26
Figura 13. Protocolo para extração e derivatização de ácidos graxos.....	32
Figura 14. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de acordo com as três repetições de <i>Mucor circinelloides</i> f. <i>janssenii</i> , cujas análises foram realizadas em 12/04/96 (1), 18/04/96 (2) e 02/05/96 (3).....	38
Figura 15. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de acordo com as duas repetições de <i>Backusella lamprospora</i> , cujas análises foram realizadas em 18/04/96 (2) e 02/05/96 (3).....	39
Figura 16. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de acordo com as três repetições de <i>Circinella simplex</i> , cujas análises foram realizadas em 12/04/96 (1), 18/04/96 (2) e 02/05/96 (3).	40
Figura 17. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de acordo com as duas repetições de <i>Rhizomucor miehei</i> , cujas análises foram realizadas em 18/04/96 (2) e 01/05/96 (3).....	41
Figura 18. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de acordo com as duas repetições de <i>Rhizomucor pusillus</i> , cujas análises foram realizadas em 11/04/96 (1) e 18/04/96 (2).....	42

Figura 19. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de acordo com as duas repetições de <i>Mortierella ramanniana</i> , cujas análises foram realizadas em 13/04/96 (1) e 02/05/96 (3).....	44
Figura 20. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de acordo com as três repetições de <i>Benjaminiella youngii</i> , cujas análises foram realizadas em 13/04/96 (1), 18/04/96 (2) e 03/05/96 (3).	45
Figura 21. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de acordo com as duas repetições de <i>Mycotypha microspora</i> A, cujas análises foram realizadas em 20/04/96 (2) e 03/05/96 (3).....	46
Figura 22. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de acordo com as três repetições de <i>Mycotypha microspora</i> B, cujas análises foram realizadas em 13/04/96 (1), 20/04/96 (2) e 03/05/96 (3).	46
Figura 23. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de acordo com as três repetições de <i>Cunninghamella blakesleeana</i> A ₁ , cujas análises foram realizadas em 11/04/96 (1), 18/04/96 (2) e 01/05/96 (3).....	48
Figura 24. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de acordo com as duas repetições de <i>Cunninghamella blakesleeana</i> A ₂ , cujas análises foram realizadas em 11/04/96 (1) e 18/04/96 (2).	48
Figura 25. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de acordo com as três repetições de <i>Volutella</i> sp., cujas análises foram realizadas em 13/04/96 (1), 20/04/96 (2) e 03/05/96 (3).....	49
Figura 26. Dendograma representando as relações entre os fungos analisados baseado na análise numérica (S _y /UPGMA) dos perfis de ácidos graxos.	54

ABSTRACT

The fungi have been biochemically characterised by means of several techniques, including the profile of their fatty acids identified by gas liquid chromatography, which is already a widely used chemotaxonomic tool for characterisation and identification of bacteria and yeasts. In the present study this technique was applied to the biochemical characterisation of strains of nine fungi belonging to the order Mucorales (Zygomycetes) and one asexual representative belonging to the Ascomycetes. The fatty acid methyl esters from each strain were qualitatively analysed by gas liquid chromatography using a standard suitable for Zygomycetes fungi. The strains were clustered according to the fatty acid methyl esters profiles similarities. The fatty acids present in all strains were palmitic (16:0), oleic (18:1 ω 9), linoleic (18:2 ω 6) and γ -linolenic acid (18:3 ω 6), with the exception that the last one was not found in *Volutella* sp. Chemotaxonomic markers were obtained for a few strains, the non-identified fatty acid FAME8 (with 27,92 and 28,28 minutes as minimum and maximum retention times) for *Rhizomucor miehei* CCT 2236 and *Rhizomucor pusillus* CCT 4133, and the non-identified fatty acid FAME3 (with 16,53 and 16,61 minutes as minimum and maximum) for *Benjaminiella youngii* CCT 4121. For the order Mucorales the obtained chemotaxonomic marker was the fatty acid 18:3 ω 6, confirming the literature data. This study suggests that fatty acid profiles may be a useful chemotaxonomic criterion to be applied in addition to the morphological taxonomy of these fungi.

I. INTRODUÇÃO

Os fungos possuem diversas propriedades de aplicação industrial, principalmente na indústria de alimentos e farmacêutica. No meio ambiente, fungos atuam na degradação de matéria orgânica, um processo de grande importância na ciclagem de nutrientes (GRAVESEN *et alii*, 1994).

A ordem Mucorales, classe Zigomicetos, é de grande importância econômica. Algumas de suas espécies são usadas para a produção industrial de proteases, como a renina, álcoois e ácidos orgânicos, incluindo ácidos graxos (GRAVESEN *et alii*, 1994). Ácidos graxos poliinsaturados são importantes na alimentação humana e empregados como precursores farmacológicos (BEYNEN & KATAN, 1989). A ordem também inclui espécies contaminantes de alimentos estocados, como grãos, legumes e frutas, além de espécies de ocorrência comum na vida doméstica, como as causadoras do emboloramento de pão (GRAVESEN *et alii*, 1994).

Os Mucorales são cosmopolitas, sapróbios ou parasitas facultativos de plantas e animais, incluindo o homem. São caracterizados por apresentarem micélio cenocítico, ou seja, não septado e ramificado, e por possuírem propagação assexual através de esporos e reprodução sexual através de zigosporos. Além do seu estado filamentosos, alguns fungos desta ordem podem apresentar um estado leveduriforme dependendo das condições de cultivo (BENJAMIN, 1959; HAWKSWORTH *et alii*, 1995).

A ordem se divide em treze famílias: Chaetocladiaceae, Choanephoraceae, Cunninghamellaceae, Gilbertellaceae, Mortierellaceae, Mucoraceae, Mycotyphaceae, Phycomycetaceae, Pilobolaceae, Radiomycetaceae, Saksenaaceae, Syncephalastraceae e Thamniaceae (HAWKSWORTH *et alii*, 1995).

A taxonomia de fungos filamentosos é baseada principalmente em critérios morfológicos. Contudo, o estudo de fungos com grande proximidade taxonômica, que não esporulam, ou cujo ciclo de vida não seja conhecido é limitado pela escassez de caracteres morfológicos diferenciais (JABAJI-HARE, 1988; BLOMQUIST *et alii*; 1992). Para contornar estas dificuldades e visando a classificação sob a perspectiva filogenética, ou seja, que reflitam a história evolutiva dos fungos, métodos moleculares e bioquímicos têm sido de grande valia, como o sequenciamento de ácidos nucleicos e proteínas, e determinação de componentes celulares, como a composição de ácidos graxos (SHAW, 1966b; BLOMQUIST *et alii*; 1992).

Além dos constituintes primários citados, os constituintes celulares secundários, cuja distribuição é mais limitada, são bastante conhecidos nos fungos e também podem ser úteis na sua taxonomia. Alguns exemplos são os compostos acetilênicos, pigmentos, uréia (TYRRELL, 1969) e polissacarídeos extracelulares antigênicos (RUITER *et alii*, 1993).

O potencial dos constituintes celulares para a taxonomia microbiana depende da variabilidade da sua ocorrência, rapidez e simplicidade dos métodos utilizados para a sua análise. O sequenciamento de ácidos nucleicos e a análise de ácidos graxos são dois dos métodos mais versáteis e promissores para a taxonomia de microrganismos (BÖTTGER, 1996). A utilização de ácidos graxos na taxonomia microbiana teve um grande avanço graças ao advento da cromatografia gás-liquída (BLOMQUIST *et alii*, 1992).

Os ácidos graxos são as unidades fundamentais da maioria dos lipídios. São ácidos orgânicos, geralmente contendo de 4 a 24 átomos de carbono, possuem um grupo carboxila único e uma cauda hidrocarbonada não-polar com um grupo metil terminal. Os ácidos graxos ocorrem sob a forma livre ou sob formas covalentemente ligadas a alcoóis e a outros componentes, e podem ser liberados através de hidrólise química ou enzimática (LEHNINGER, 1988; BOBBIO & BOBBIO, 1992). Após a hidrólise, os ácidos graxos podem ser derivatizados quimicamente, tornando-se voláteis, e analisados por cromatografia gasosa para determinação do comprimento de cadeia e grau de insaturação (CHRISTIE, 1982; RATLEDGE & WILKINSON, 1988a).

2. OBJETIVOS

Caracterizar bioquimicamente, através da análise qualitativa de ácidos graxos, representantes da ordem Mucorales, visando:

- avaliar a importância do perfil de ácidos graxos na diferenciação de organismos pertencentes à ordem Mucorales; e,
- determinar marcadores quimiotaxonômicos, *i.e.*, ácidos graxos, para os fungos estudados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Lipídios e Ácidos Graxos

3.1.1. Lipídios

Lipídios, juntamente com os carboidratos e as proteínas, formam o grupo de compostos mais importantes em alimentos e mais frequentemente encontrados em vegetais e animais (BOBBIO & BOBBIO, 1992). Os lipídios são insolúveis em água e prontamente solúveis em solventes orgânicos, como, por exemplo clorofórmio, hexano, metanol, benzeno, alcoóis e éteres (CHRISTIE, 1982; RATLEDGE & WILKINSON, 1988a).

Os lipídios são classificados como simples, quando são constituídos por ácidos graxos e alcoóis; como compostos, quando são constituídos por outros grupos na molécula, além de ácidos graxos e alcoóis; e os lipídios derivados são as substâncias obtidas por hidrólise dos lipídios simples e compostos (BOBBIO & BOBBIO, 1992). Os ácidos graxos podem estar ligados ao glicerol (triglicerídio), bases de cadeias longas (esfingolipídios), ácidos fosfóricos (fosfolipídios), açúcares (glicolipídios) ou componentes mais complexos (CHRISTIE, 1982).

Os lipídios constituem material de reserva em animais, plantas e microrganismos, sendo que, no caso dos eucariontes, os triglicerídios são os principais responsáveis por este papel. São também constituintes da membrana celular, como os fosfolipídios, tomam parte nos processos fotossintéticos e também em outros processos geradores de energia (BRENNAN & LÖSEL, 1978; HARWOOD & RUSSELL, 1984; RATLEDGE & WILKINSON, 1988a).

As vias de biossíntese de lipídios em microrganismos são equivalentes àquelas encontradas em animais e plantas. Os microrganismos realizam a síntese de seus compostos celulares com grande velocidade e conseqüentemente respondem a mudanças ambientais da mesma forma (RATLEDGE & WILKINSON, 1988a). Sendo assim, o conteúdo lipídico da célula microbiana pode variar qualitativamente e quantitativamente de acordo com as condições de seu crescimento e a sua fase de desenvolvimento.

3.1.2. Ácidos Graxos

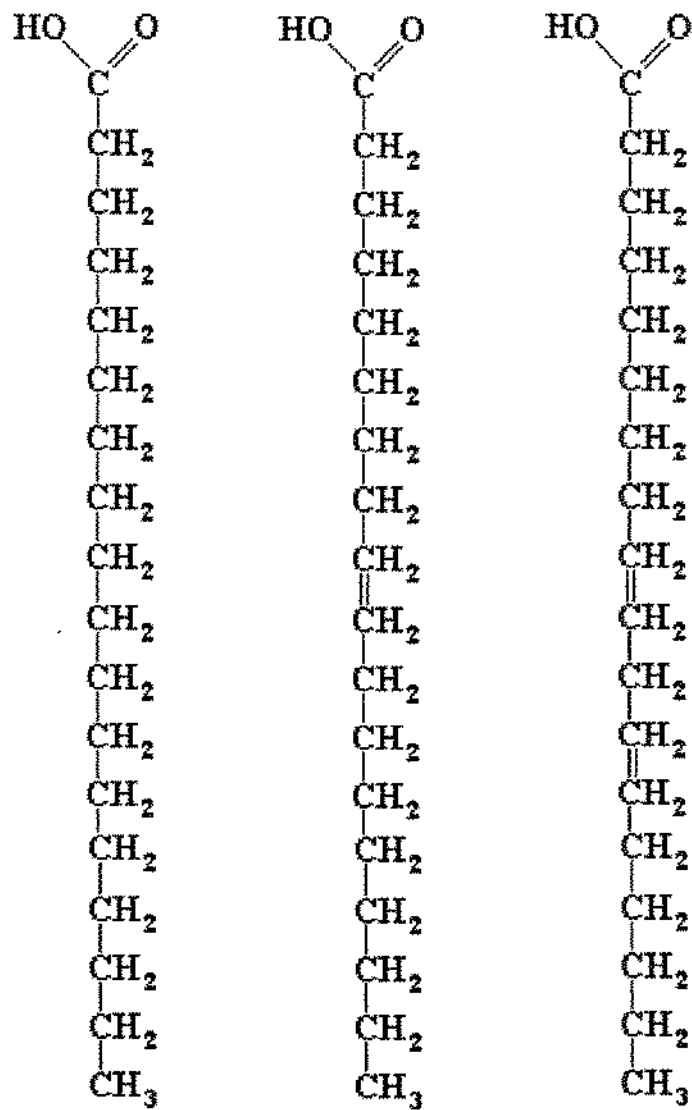
Ácido graxo é um termo que designa qualquer ácido monocarboxílico alifático que pode ser liberado de gorduras e óleos naturais por hidrólise. A nomenclatura usada para os ácidos graxos, recomendada pela Comissão de Nomenclatura Bioquímica, consiste na determinação do número de carbonos e da presença, número e posição de duplas ligações. Os átomos de carbono são numerados a partir do carbono carboxílico, denominado carbono 1 ou C1, terminando no grupo metil presente na extremidade oposta da cadeia (IUPAC-IUB, 1978).

A posição de duplas ligações na cadeia do ácido graxo é determinada pela via biossintética no microrganismo. Assim, ácidos graxos saturados não apresentam duplas ligações, enquanto que os insaturados podem apresentar uma, duas ou mais duplas ligações (CHRISTIE, 1982; LEHNINGER, 1988; RATLEDGE & WILKINSON 1988b; EMBLEY & WAIT, 1994).

Os ácidos graxos saturados mais comuns possuem cadeias lineares com número par de átomos de carbono que vão de 14 a 20 (Figura 1), embora seja possível encontrar cadeias ímpares. Por exemplo, o ácido graxo de 16 carbonos é chamado de ácido hexadecanóico e recebe também um nome trivial, ácido palmítico, e para simplificar pode ser representado simplesmente como 16:0 (Tabela 1) (IUPAC-IUB, 1978; CHRISTIE, 1982; RATLEDGE & WILKINSON 1988b).

Ácidos graxos que apresentam uma única dupla ligação na sua cadeia (Figura 1), que pode ter de 10 a 30 átomos de carbono, são chamados monoinsaturados (Tabela 2). A dupla ligação possui geralmente configuração *cis* e mais raramente *trans*. Por exemplo, quando o ácido graxo possui 18 carbonos e apresenta dupla ligação entre os carbonos 9 e 10, é representado como ácido *cis*-9-octadecenóico, também como ácido 9(Z)-octadecenóico, ou ainda de uma forma abreviada, como 18:1 ou indicando a posição da dupla ligação, 18:1 (9) (IUPAC-IUB, 1977 citado por CHRISTIE, 1982; IUPAC-IUB, 1978; RATLEDGE & WILKINSON 1988b).

O tipo de insaturação pode ser designado na forma de ($n-x$), onde n representa o número de carbonos da cadeia e x o número de carbonos a partir da última dupla ligação na direção do grupo metil terminal. Por exemplo, o ácido oléico é 18:1($n-9$) ou também 18:1($\omega 9$). Esta designação também define o tipo de família ao qual o ácido graxo pertence, neste caso a família $\omega 9$ (KORN *et alii*, 1965; IUPAC-IUB, 1978; RATLEDGE & WILKINSON 1988b).



Ácido esteárico

Ácido oléico

Ácido linoléico

Figura 1. Três ácidos graxos comuns, mostrados na fórmula estrutural.

Tabela 1. Alguns ácidos graxos saturados de cadeia linear.

Nome sistemático	Nome trivial	Abreviação
Ácido decanóico	Ácido cáprico	10:0
Ácido dodecanóico	Ácido láurico	12:0
Ácido tetradecanóico	Ácido mirístico	14:0
Ácido pentadecanóico	—	15:0
Ácido hexadecanóico	Ácido palmítico	16:0
Ácido heptadecanóico	Ácido margárico	17:0
Ácido octadecanóico	Ácido esteárico	18:0
Ácido nonadecanóico	—	19:0
Ácido icosanóico	Ácido araquídico	20:0
Ácido docosanóico	Ácido beênico	22:0
Ácido tetracosanóico	Ácido lignocérico	24:0

Tabela 2. Alguns ácidos graxos insaturados de cadeia linear.

Nome sistemático	Nome trivial	Abreviação
Ácido <i>cis</i> -hexadec-9-enóico	Ácido palmitoléico	16:1(ω 7)
Ácido <i>cis</i> -octadec-9-enóico	Ácido oléico	18:1(ω 9)
Ácido 9,12-octadecadienóico	Ácido linoléico	18:2(ω 6)
Ácido 9,12,15-octadecatrienóico	Ácido α -linolênico	18:3(ω 3)
Ácido 6,9,12-octadecatrienóico	Ácido γ -linolênico	18:3(ω 6)
Ácido 8,11,14-icosatrienóico	Ácido homo- γ -linolênico	20:3(ω 6)
Ácido 5,8,11,14-icosatetraenóico	Ácido araquidônico	20:4(ω 6)

Os ácidos graxos poliinsaturados são aqueles que possuem mais de uma dupla ligação (Figura 1, Tabela 2), e estão subdivididos em famílias de acordo com sua derivação biossintética que ocorre por desaturação (introdução de uma dupla ligação) e alongação (introdução de dois átomos de carbono) da cadeia a partir de um único ácido graxo precursor. No caso das famílias ω_3 e ω_6 o precursor é o ácido linoléico ou 18:2(ω_6) (Figura 2) (KORN *et alii*, 1965; SHAW, 1966b; CHRISTIE, 1982; RATLEDGE & WILKINSON, 1988b; WESTHUIZEN *et alii*, 1994).

3.2. Análise de Ácidos Graxos

Moléculas orgânicas podem ser usadas como marcadores taxonômicos se forem estáveis e tiverem distribuição descontínua entre os diferentes taxa (SUZUKI *et alii*, 1993). Dentre estas moléculas estão os ácidos graxos, os quais estão entre os componentes celulares mais utilizados para o exame quimiotaxonômico de fungos (SHAW, 1966b; BRONDZ & OLSEN, 1986).

A composição de ácidos graxos é mais comumente determinada através de análises por cromatografia gás-líquida, a qual requer modificações dos ácidos graxos através de derivação química, convertendo-os em moléculas mais voláteis, os ésteres metílicos de ácidos graxos, também designados de forma abreviada por FAMES, do inglês *Fatty Acid Methyl Esters* (CHRISTIE, 1982; EMBLEY & WAIT, 1994).

A análise direta dos ácidos graxos pode ser realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência, e a confirmação das estruturas de ácidos graxos através de procedimentos espectroscópicos e de degradação química (CHRISTIE, 1982).

A cromatografia gás-líquida possui uma fase gasosa móvel e uma fase líquida estacionária entre as quais os FAMES são separados. Esta separação ocorre na coluna do cromatógrafo, onde os compostos com menor afinidade pela fase estacionária eluem mais rapidamente. O tempo entre a aplicação da amostra e sua eluição, específico para cada composto, é chamado de tempo de retenção (BÖTTGER, 1996).

As colunas capilares são mais eficientes e rápidas para a separação de FAMES que as colunas empacotadas (EMBLEY & WAIT, 1994). A coluna capilar possui um suporte sólido recoberto por um líquido pouco volátil, o qual funciona como fase estacionária (COLLINS *et alii*, 1993). O tipo de fase estacionária é o principal fator que determina a natureza das separações obtidas pela coluna (CHRISTIE, 1982).

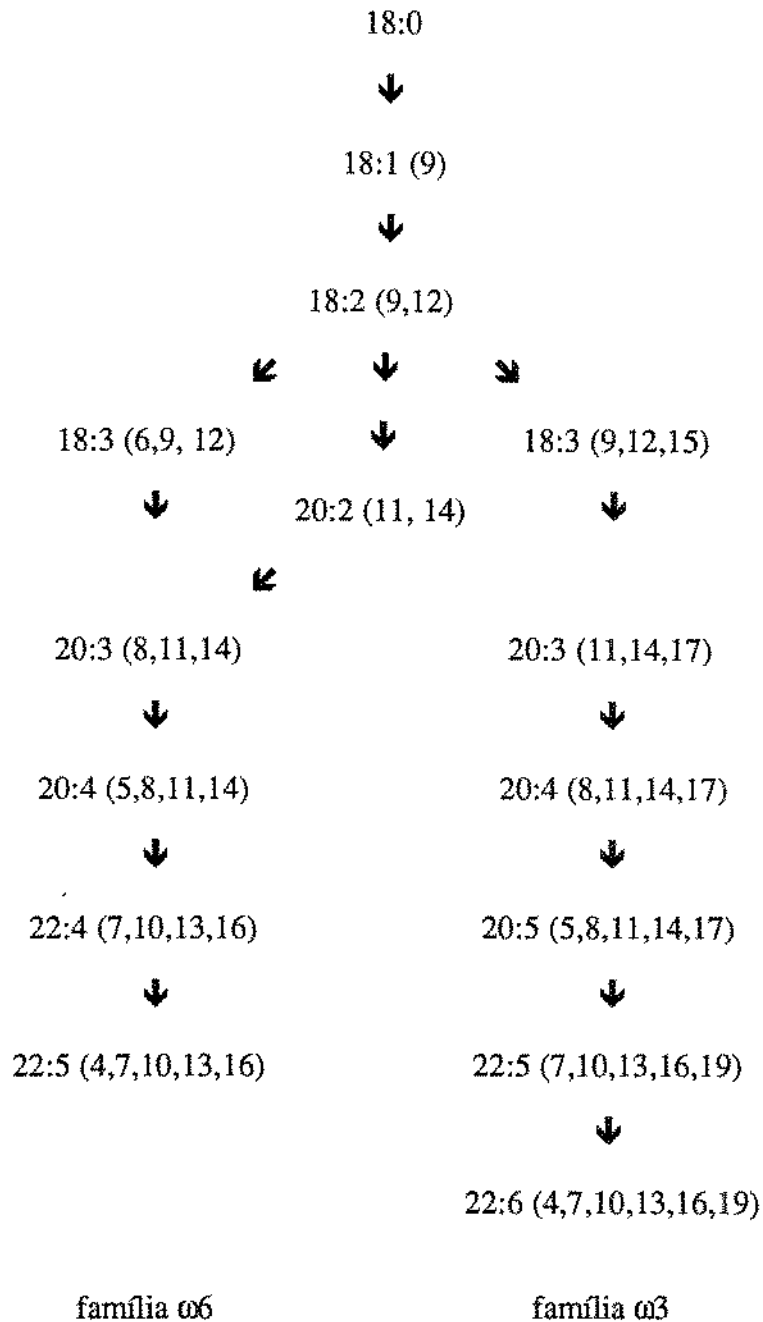


Figura 2. Esquema da via biossintética de ácidos graxos insaturados em microrganismos, com as diversas etapas de desaturação (introdução de uma dupla ligação) e de alongação (introdução de dois átomos de carbono) a partir de um único ácido graxo precursor, baseado em KORN *et alii* (1965). Os números entre parênteses indicam as posições de cada dupla ligação na cadeia de carbono.

Há dois tipos de fases estacionárias, fases apolares, que permitem a separação dos FAMES baseada em seu peso molecular, e fases polares, que permitem uma clara separação dos FAMES com o mesmo comprimento de cadeia, sendo que os insaturados são eluídos depois dos saturados correspondentes. Por exemplo, o ácido graxo insaturado 16:1 é eluído depois do ácido graxo saturado 16:0. Fases polares permitem uma maior resolução de insaturados e portanto são as mais adequadas para a separação de FAMES (CHRISTIE, 1982).

3.3. Condições para Utilização Quimiotaxonômica de Ácidos Graxos

A análise do perfil de ácidos graxos de microrganismos como ferramenta quimiotaxonômica requer o controle cuidadoso das variações causadas por fatores externos, como temperatura de crescimento, tempo de incubação e meio de cultura. Perfis de ácidos graxos reprodutíveis podem ser obtidos com o controle rigoroso destas variáveis (RATLEDGE, 1982; BRONDZ & OLSEN, 1986; LÖSEL, 1988).

Maior reprodutibilidade é obtida em cultivos coletados durante a fase estacionária ou no crescimento tardio, pois a composição dos ácidos graxos é mais estável uma vez que a atividade metabólica de síntese de ácidos graxos, reações de alongação e de desaturação é reduzida (COONEY *et alii*, 1993; WESTHUIZEN *et alii*, 1994).

A interferência da temperatura na reprodutibilidade da análise de ácidos graxos se correlaciona com o aumento do grau de insaturação de ácidos graxos dos fosfolipídios da membrana celular à medida que a temperatura ambiente diminui. Este fenômeno ocorre devido ao fato de que quanto mais insaturado for o ácido graxo, mais líquido este será devido ao seu baixo ponto de fusão proporcionado pelas duplas ligações.

Os fosfolipídios possuem a capacidade de manter a fluidez adequada da membrana celular em resposta à temperatura de crescimento (RATLEDGE & WILKINSON, 1988a). A membrana celular difere entre organismos psicrófilos, mesófilos e termófilos como consequência da constituição dos fosfolipídios (HAMMONDS & SMITH, 1986). Vários estudos, incluindo alguns com fungos da ordem Mucorales, relatam as diferenças encontradas nos perfis de ácidos graxos de fungos psicrófilos, mesófilos e termófilos, demonstrando que o grau de insaturação varia em consequência da diferença na necessidade de temperatura para o desenvolvimento destes fungos (SUMNER & MORGAN, 1969; MUMMA *et alii*, 1971; DEXTER & COOKE, 1984; HAMMONDS & SMITH, 1986).

Os psicrófilos apresentam ácidos graxos mais insaturados do que os demais, podendo significar uma adaptação para seu desenvolvimento à baixas temperaturas (HAMMONDS & SMITH, 1986). No estudo realizado por DEXTER e COOKE (1984) foi demonstrado que o fungo psicrófilo *Mucor strictus* apresentou ácidos graxos mais insaturados do que representantes mesófilos de *Mucor* e que o grau de insaturação aumentou com a diminuição da temperatura.

Os representantes termófilos, como exemplo *Rhizomucor pusillus*, apresentaram ácidos graxos com maior grau de saturação e maior número de carbonos em suas cadeias. Grandes quantidades de ácidos graxos saturados e 18:1 foram detectados nestas linhagens. A natureza mais saturada dos fosfolipídios presentes nos termófilos permite maior termoestabilidade e determina os mais baixos limites de temperatura de funcionalidade das membranas (MUMMA *et alii*, 1971; HAMMONDS & SMITH, 1986).

3.4. Ácidos Graxos na Quimiotaxonomia de Fungos

Os primeiros estudos sobre a utilização do perfil de ácidos graxos como critério taxonômico para os fungos filamentosos foram realizados na década de 60 por SHAW (1965, 1966a, 1966b, 1967). Em seu primeiro estudo, SHAW (1965) analisou ácidos graxos de 31 espécies de fungos, pertencentes às classes Oomicetos, Zigomicetos, Ascomicetos e Basidiomicetos e detectou a presença do ácido graxo γ -linolênico, 18:3 (6,9,12), da família ω_6 , somente nos representantes dos Oomicetos e Zigomicetos. A ordem Mucorales apresentou maior quantidade deste ácido graxo (SHAW, 1965). Praticamente todas as espécies desta ordem sintetizam este ácido graxo, além do ácido linoléico, 18:2 (9,12), da família ω_6 (WASSEF, 1977). A produção de ácidos graxos poliinsaturados da família ω_6 não foi registrada nos Ascomicetos e Basidiomicetos (SHAW, 1965).

Num estudo posterior, confirmando os resultados de SHAW (1965), foi observado que a maioria dos Zigomicetos produziu ácidos graxos poliinsaturados de 18 carbonos, em particular o ácido graxo γ -linolênico e não produziu ácidos poliinsaturados de 20 carbonos. Os Oomicetos foram caracterizados pela presença de ácidos graxos da família ω_6 (WESTHUIZEN *et alii*, 1994).

O ácido α -linolênico, 18:3 (ω_3), não foi encontrado nos Ficomicetos (classe que acomoda os Oomicetos, Zigomicetos e Quitridiomicetes, por apresentarem micélio não septado) mas sim nas classes Ascomicetos, Basidiomicetos e nas suas fases anamórficas (fungos que apresentam estado assexual).

Alguns representantes destas classes produzem ácidos graxos somente até 18:2 (SHAW, 1966b; WESTHUIZEN *et alii*, 1994).

De acordo com a distribuição de ácidos graxos das famílias $\omega 6$ e $\omega 3$, principalmente dos ácidos graxos γ -linolênico, 18:3 ($\omega 6$), e α -linolênico, 18:3 ($\omega 3$), foi constatado que havia uma diferença bioquímica entre os Ficomicetos e as classes Ascomicetos e Basidiomicetos, sugerindo uma relação filogenética distante entre eles (SHAW, 1965, 1966b; WESTHUIZEN *et alii*, 1994).

A partir destas observações, SHAW (1966b) concluiu que as análises dos ácidos graxos e a capacidade ou não de sintetizá-los servem como base para detectar relações filogenéticas entre os fungos e seus possíveis ancestrais. Esta conclusão é complementada por WESTHUIZEN *et alii* (1994), ao afirmar que a presença de ácidos graxos das famílias $\omega 6$ e $\omega 3$ é um fator discriminante para fungos pertencentes às diferentes classes.

Os ácidos graxos dos Ascomicetos e dos fungos anamórficos correspondentes, em geral, não fornecem bons marcadores taxonômicos, devido a grande similaridade na sua composição entre os membros desta classe, embora pertencentes a diferentes taxa. Os Ascomicetos produzem geralmente baixa quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, e, quando o fazem, o ácido graxo poliinsaturado mais comum é o ácido α -linolênico (LECHEVALIER & LECHEVALIER, 1988).

O gênero *Conidiobolus*, caracterizado como fungo saprofítico encontrado principalmente em material vegetal em decomposição, possui grande proximidade com o gênero *Entomophthora*, um grupo de entomopatógenos. Estes dois gêneros foram separados por possuírem modos de vida distintos. Como critério adicional à entomopatogenicidade para separar estes dois gêneros da família Entomophthoraceae (Zigomicetos), utilizou-se a composição de ácidos graxos (TYRRELL, 1967, 1968, 1971).

A composição de ácidos graxos de 17 isolados do gênero *Entomophthora* foi comparada com a de outros fungos, incluindo *Conidiobolus*, com o objetivo de verificar a utilidade do perfil de ácidos graxos na taxonomia deste gênero. De todos os fungos analisados, a composição de ácidos graxos de *Conidiobolus* foi a que se mostrou mais próxima à composição de *Entomophthora* (TYRRELL, 1967). O resultado obtido por SHAW (1965) foi confirmado uma vez que a ocorrência do ácido γ -linolênico foi demonstrada em todos os *Entomophthora* e *Conidiobolus* estudados, assim como em *Phytophthora infestans* e *Pythium debaryanum* (Oomicetos).

Em outro trabalho, o isolamento e a caracterização de três ácidos graxos de cadeia ramificada do fungo *Conidiobolus denaesporus* foram descritos, os quais representavam 35% do total de seus ácidos graxos. Esta característica foi encontrada somente nesta espécie dentro da família Entomophthoraceae, diferenciando-a dos demais fungos do mesmo gênero e da mesma família (TYRRELL, 1968). Estes ácidos graxos são geralmente raros em fungos, ao contrário de bactérias (RATLEDGE, 1982).

A composição de ácidos graxos de 12 espécies de *Conidiobolus*, incluindo 7 espécies formadoras de zigósporo e outras 5 que apresentam somente propagação assexual, foi determinada e a similaridade entre as linhagens *C. heterosporus* e *C. denaesporus* estimada. Estes dados, quando considerados juntamente com dados morfológicos e outros dados obtidos independentemente, puderam servir como evidência para a conclusão de que os nomes *C. heterosporus* e *C. denaesporus* eram sinônimos e que os isolados representavam uma única espécie de fungo (TYRRELL, 1971).

Ao serem analisados os ácidos graxos de isolados de *Mortierella* subgen. *Micromucor* e de *Mortierella* subgen. *Mortierella*, por cromatografia gás-líquida, o significado quimiotaxonômico da composição de ácidos graxos na taxonomia e identificação deste gênero foi explorado (AMANO *et alii*, 1992). Os dois subgêneros são normalmente distinguidos entre si por suas características morfológicas e de cultivo em placa (GAMS, 1977, citado por AMANO *et alii*, 1992). Os resultados obtidos por AMANO *et alii* (1992) confirmaram um trabalho anterior (SHINMEN *et alii*, 1989), no qual estes mesmos fungos foram diferenciados pelo fato de somente o subgênero *Mortierella* apresentar os ácidos poliinsaturados com cadeia de 20 carbonos. A diferença entre a composição de ácidos graxos dos dois subgêneros coincide com a diferença das características morfológicas e de cultivo em placa dos mesmos. Portanto a composição de ácidos graxos se apresenta como um critério útil na taxonomia e identificação do gênero *Mortierella* (AMANO *et alii*, 1992).

A análise da composição de ácidos graxos foi utilizada para confirmar a identificação de *Ganoderma australe* (Basidiomicetos) do Chile, anteriormente identificada erroneamente como outra espécie do mesmo gênero, *G. applanatum*. Os resultados demonstraram que se tratava de *G. australe* e não de *G. applanatum* (MARTÍNEZ *et alii*, 1991). Através do uso da análise de ácidos graxos, os autores obtiveram um critério adicional que permitiu uma identificação acurada desta espécie de *Ganoderma*, a qual é responsável pela degradação seletiva de lignina.

As estruturas de propagação assexual da espécie *Gigaspora margarita* e de três espécies de *Glomus*, fungos endomicorrízicos (associados internamente a raízes por simbiose) pertencentes à ordem

Glomales (HAWKSWORTH *et alii*, 1995), tiveram sua composição de ácidos graxos analisada. Embora não se conheça seu ciclo de vida completo e fase sexual, estes fungos foram classificados como Zigomicetos. Estudos bioquímicos destes fungos poderiam ser úteis na determinação de sua verdadeira posição taxonômica (JABAJI-HARE, 1988).

Os ácidos graxos 16:0, 16:1, 18:0, 18:1 e 19:0 foram encontrados como ácidos predominantes em *Gigaspora margarita* e nas três espécies de *Glomus*. Além destes, também foram encontrados ambos os isômeros do ácido graxo linolênico, o γ -linolênico e o α -linolênico. De acordo com o autor, a presença dos isômeros deste ácido graxo e do ácido graxo 19:0, e ainda a capacidade de sintetizar ácidos graxos com cadeia maior do que 18 carbonos, sugerem que estes fungos estariam mais próximos à classe Mixomicetes do que à classe Zigomicetos (JABAJI-HARE, 1988).

SANCHOLLE e DALPÉ (1993) realizaram as análises comparativas do conteúdo de ácidos graxos de esporos de sete fungos endomicorrízicos do gênero *Glomus*, de dois fungos endomicorrízicos dos gêneros *Acaulospora* e *Scutellospora*, todos da ordem Glomales, e do fungo saprofítico *Endogone pisiformis*, da ordem Endogonales, supostamente relacionado taxonomicamente aos primeiros. Este estudo comparativo dos fungos endogonaceos e endomicorrízicos resultou na identificação dos ácidos graxos mais comuns em fungos, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1 e 18:2 (SHAW, 1965, 1966b; LÖSEL, 1988). Os fungos foram divididos em três grupos de acordo com os perfis de ácidos graxos: *Endogone pisiformis* por apresentar o ácido α e γ -linolênico, *Acaulospora nicolsonii* pela presença de ácidos monoinsaturados com configuração *trans*, e os endomicorrízicos pela ausência de isômeros do ácido linolênico e presença de poliinsaturados de cadeia longa (SANCHOLLE & DALPÉ, 1993).

Os ácidos graxos de isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1, importante patógeno de arroz, foram examinados usando um método rápido, sensível e reprodutível, desenvolvido em 1985 por MILLER e BERGER, para análise de ácidos graxos de bactérias (JOHNK & JONES, 1992). O método foi adaptado para fungos e utilizado com o sistema de análise cromatográfica MIDI (Microbial Identification System, Microbial ID, Inc., Newark, Del.). Este programa foi desenvolvido inicialmente para identificar ácidos graxos e estudar relações entre bactérias (SASSER, 1990), usando diferenças quantitativas e qualitativas no conteúdo de ácidos graxos. O sistema MIDI, após modificação, pôde ser aplicado com sucesso para analisar os ácidos graxos de *R. solani*.

A mesma metodologia foi utilizada para identificar e comparar a composição de ácidos graxos de isolados representando grupos intraespecíficos de *Rhizoctonia solani* AG-1 (JOHNK & JONES, 1994).

Embora não tenha sido possível a diferenciação de todos os grupos intraespecíficos de *R. solani* AG-1 neste estudo, JOHNS *et alii* (1993) puderam caracterizar e diferenciar populações com hospedeiros específicos e grupos intraespecíficos de *R. solani* AG2-2 e AG-3 utilizando o MIDI.

O MIDI foi novamente utilizado para a caracterização dos perfis de ácidos graxos de 53 isolados, representando 24 espécies de fungos endomicorrízicos da ordem Glomales. O estudo teve como objetivo a avaliação da diversidade fúngica, levando à uma aplicação taxonômica e diagnóstica (GRAHAM *et alii*, 1995).

O método utilizado por GRAHAM *et alii* (1995) para a extração dos ácidos graxos dos fungos endomicorrízicos foi originalmente desenvolvido por SASSER (1990) para o estudo de células bacterianas, nas quais os ácidos graxos são derivados a ésteres metílicos. Os esporos destes fungos analisados continham grande quantidade de ácidos graxos, como registrado previamente (JABAJI-HARE, 1988). Foram identificados 27 ácidos graxos, dos quais os ácidos 16:0, 16:1(5), 16:1(7), 18:1(9), 18:1(5), 20:0, 20:1(9) e 20:4(6,9,12,15) representavam mais de 90% dos perfis.

3.5. Fungos da Ordem Mucorales

A ordem Mucorales, classe Zigomicetos, filo Fungi, possui representantes caracterizados por apresentarem propagação assexual através de esporângios: estrutura em forma de saco onde são produzidos os esporos, geralmente em grande quantidade. Organismos com poucos, ou mesmo com esporo único, podem também ser encontrados, sendo que no caso destes últimos, as estruturas passam a ser chamadas de esporangiólos, uma forma reduzida do esporângio (GUERRERO & SILVEIRA, 1996). A reprodução sexual é por meio de zigósporos. São cosmopolitas sapróbios, alguns poucos são parasitas facultativos de animais e plantas (HAWKSWORTH *et alii*, 1995).

3.5.1. *Mucor circinelloides* f. *janssenii* (Lendn.) Schipper

O gênero *Mucor* é caracterizado morfológicamente por apresentar esporângios com grande quantidade de esporos e parede deliquescente - que se liquefaz naturalmente - e columelas bem desenvolvidas (DOMSCH *et alii*, 1980). A columela é uma estrutura estéril formada dentro do esporângio (GUERRERO & SILVEIRA, 1996). Os representantes deste gênero são isolados de solo e de fezes (DOMSCH *et alii*, 1980).

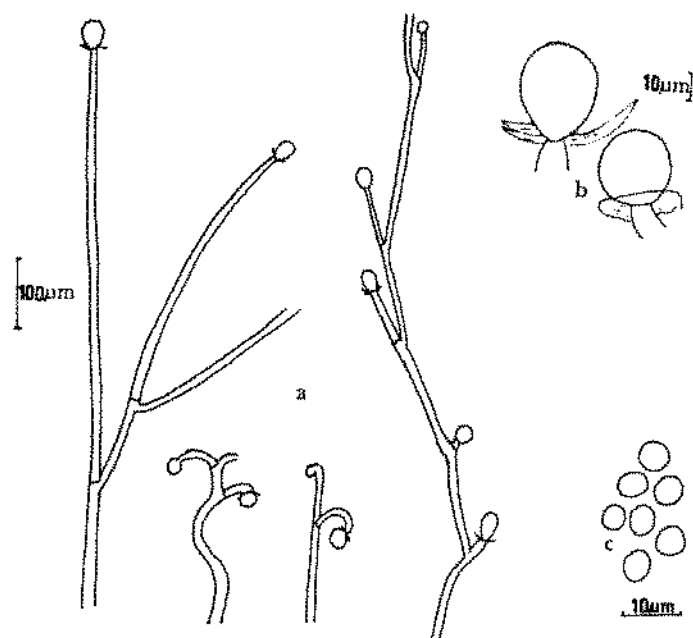


Figura 3. *Mucor circinelloides f. janssenii*, CBS 205.68. a. esporangióforos; b. columela; c. esporos (SCHIPPER, 1976).

A forma *Mucor circinelloides f. janssenii* (Lendn.) Schipper apresenta esporangióforos - hifas que sustentam esporângios - compridos e ramificados simpodialmente, além de esporangióforos curtos, que também são ramificados simpodialmente, mas cujos ramos são circinados (Figura 3) (SCHIPPER, 1976).

Representantes do gênero *Mucor* possuem 25% do seu conteúdo celular na forma de lipídios e, devido à isto, são designados como fungos oleaginosos (RATLEDGE, 1982). São também grandes produtores de ácido graxo γ -linolênico (18:3 ω 6) (TORLANOVA *et alii*, 1992), precursor do ácido araquidônico (20:4 ω 6) e ácido icosapentaenóico (20:5 ω 6), também conhecido como EPA. Estes ácidos graxos são nutricional e farmacologicamente importantes por serem necessários às membranas celulares e por serem precursores de substâncias biologicamente ativas, tais como as prostaglandinas (SHINMEN *et alii*, 1989; BAJPAI *et alii*, 1991).

3.5.2. *Backusella lamprospora* (Lendn.) Benny & R.K. Benj.

A espécie *Backusella lamprospora* (Lendn.) Benny & R.K. Benj. (Figura 4) foi inicialmente descrita como representante do gênero *Mucor*, recebendo a denominação de *Mucor lamprosporus* Lendner. Representantes do gênero *Backusella* são isolados de solo (BENNY & BENJAMIN, 1975).

A semelhança do gênero *Backusella* com *Mucor* se deve pela presença de esporângios com grande quantidade de esporos e parede deliquescente, como também pela presença de columelas. No entanto, foi distinguido de *Mucor* por apresentar esporangióolos com paredes persistentes, os quais ocorrem em *Backusella* com vários esporos ou um único esporo (BENNY & BENJAMIN, 1975).

3.5.3. *Circinella simplex* Tiegh.

A espécie *Circinella simplex* Tiegh. (Figura 5) foi descrita posteriormente como representante do gênero *Mucor*, sendo denominada de *Mucor simplex* (Tiegh.) Migula. Os substratos citados na literatura em que se encontram espécies de *Circinella* são solo, fezes e cacau fermentado (HESSELTINE & FENNELL, 1955).

A semelhança de *Circinella* com *Mucor* se deve à presença de columela, de esporângios com muitos esporos e à ausência de esporangióolos. O gênero *Circinella* foi criado para incluir fungos relacionados a *Mucor*, que se distinguem deste por produzirem esporangióforos sustentando ramos circinados, cujas extremidades terminais sustentassem esporângios globosos com parede persistente (HESSELTINE & FENNELL, 1955).

A presença de esporangióforos sustentando ramos circinados em *Circinella simplex* e *Mucor circinelloides* f. *janssenii*, confere grande semelhança entre estes dois fungos. Entretanto, *C. simplex* é diferenciada de *M. circinelloides* f. *janssenii*, por produzir esporangióforos que geralmente sustentam vários ramos secundários e apresentam ramificação variável, o que não ocorre neste último, no qual os ramos circinados são sustentados somente por esporangióforos curtos (item 3.5.1.; Figuras 3, 5) (HESSELTINE & FENNELL, 1955).

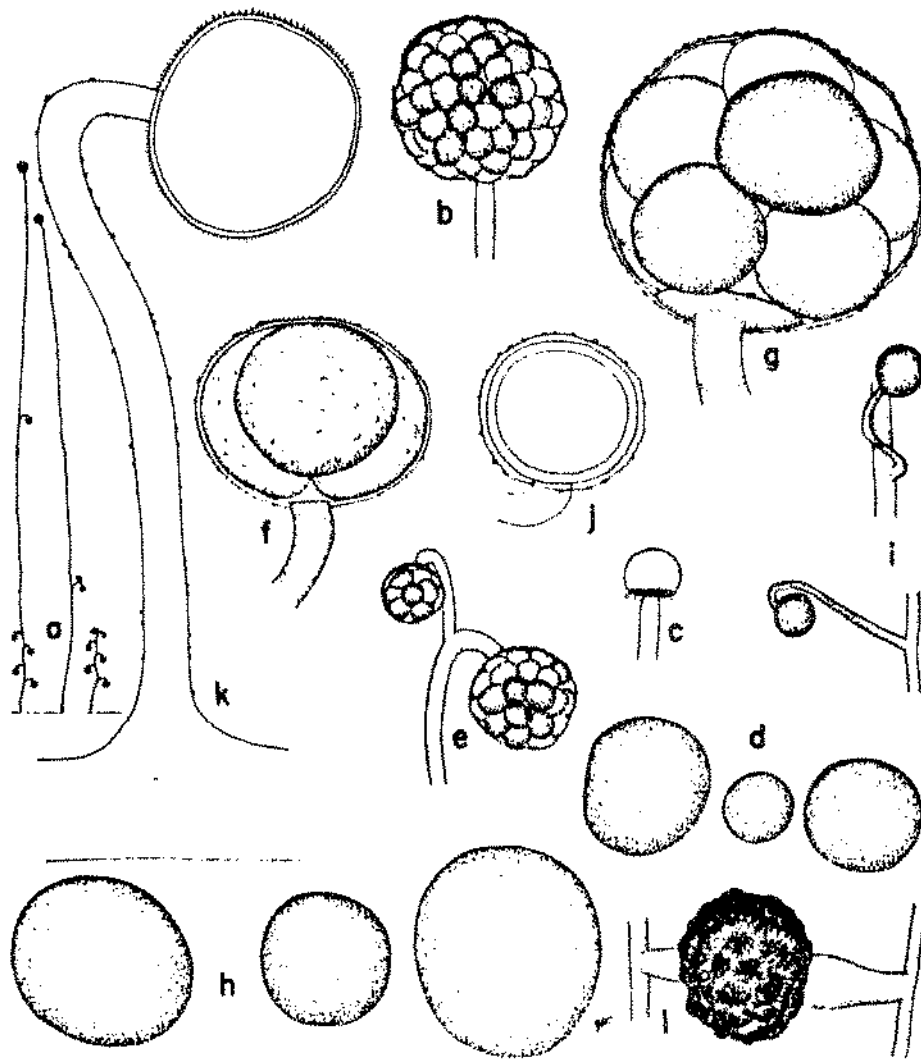


Figura 4. *Backusella lamprospora*. a. esporangióforos. X 30. b. esporângio primário. X 320. c. columela. X 320. d. esporos de esporângio primário. X 1.670. e. esporangióforo curto, com dois esporângios. X 320. f. esporângio com três esporos. X 1.670. g. esporângio com vários esporos. X 1.670. h. esporos de esporângio. X 1.670. i. segmentos de esporangióforos. X 320. j. secção óptica de esporângio com um esporo. X 1.670. k. segmento de esporangióforo sustentando esporângio com um esporo. X1.670. l. zigósporo. X320. (BENNY & BENJAMIN, 1975).

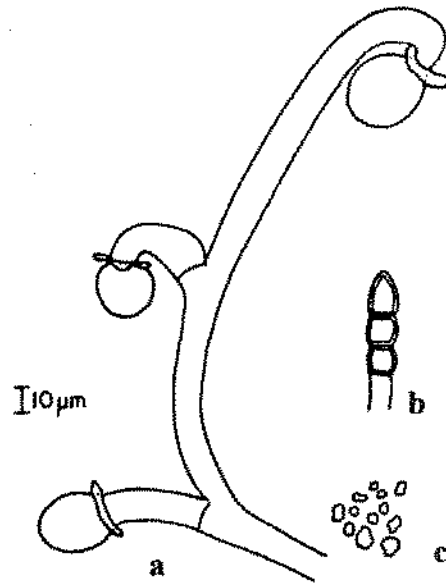


Figura 5. *Circinella simplex*. a. aspecto geral. b. clamidósporo, esporo de resistência. c. esporos. (TRUFEM, 1981)

3.5.4. *Rhizomucor miehei* (Cooney & R. Emers.) Schipper

O gênero *Rhizomucor* é distinguido de *Mucor* pela presença de rizóides e estolões, os quais podem ser simples ou levemente ramificados, como também pelo seu comportamento termófilo (DOMSCH *et alii*, 1980), que resulta num perfil de ácidos graxos característico a este comportamento. Rizóide é uma estrutura delicada e simples, semelhante a uma raiz, e estolão é uma hifa superficial que se expande formando novos rizóides e esporângios (GUERRERO & SILVEIRA, 1996). Sua semelhança com *Mucor* se deve à presença de columelas e de esporangióforos ramificados, cujas extremidades sustentam esporângios com muitos esporos (SCHIPPER, 1978).

A espécie *Rhizomucor miehei* (Cooney & R. Emers.) Schipper apresenta rizóides fracamente desenvolvidos, esporangióforos simpodialmente ramificados e columelas de obovóides à levemente piriformes (Figura 6). Já foi descrita como *Mucor miehei* Cooney & R. Emers. A espécie é produtora de uma protease, enzima coagulante utilizada na indústria de queijos substituindo a renina proveniente de bezerros (SCHIPPER, 1978).

3.5.5. *Rhizomucor pusillus* (Lindt) Schipper

A espécie *Rhizomucor pusillus* (Lindt) Schipper apresenta rizóides fracamente desenvolvidos, esporangióforos com ramificação mista, monopodial a simpodial, e columelas de obovóides à levemente piriformes (Figura 7). Já foi descrita como *Mucor pusillus* Lindt. A espécie é relatada como um causador de micose em animais (SCHIPPER, 1978).

R. miehei (item 3.5.4.) pode ser distinguido morfológicamente de *Rhizomucor pusillus*, por apresentar esporângios e columelas geralmente menores, e por apresentar esporangióforos simpodialmente ramificados, ao passo que *R. pusillus* apresenta ramificação mista, além de seus ramos se apresentarem mais curtos do que em *R. miehei* (SCHIPPER, 1978).

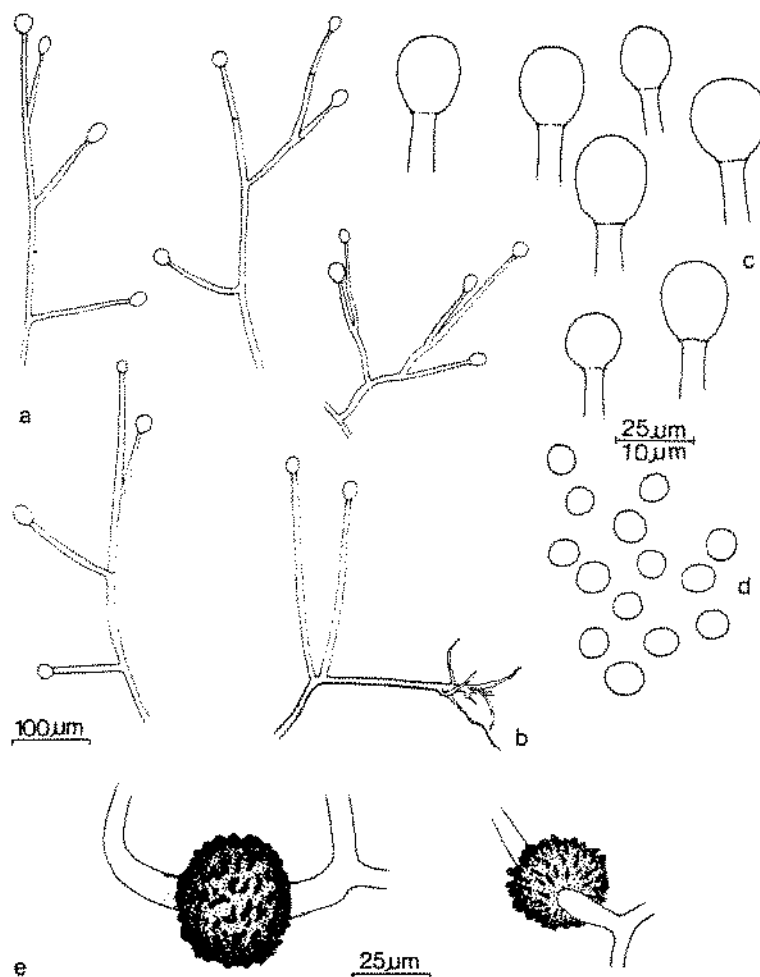


Figura 6. *Rhizomucor miehei*, CBS 182.67. a. esporangióforos. b. rizóides. c. columelas. d. esporos. e. zigósporo. (SCHIPPER, 1978).

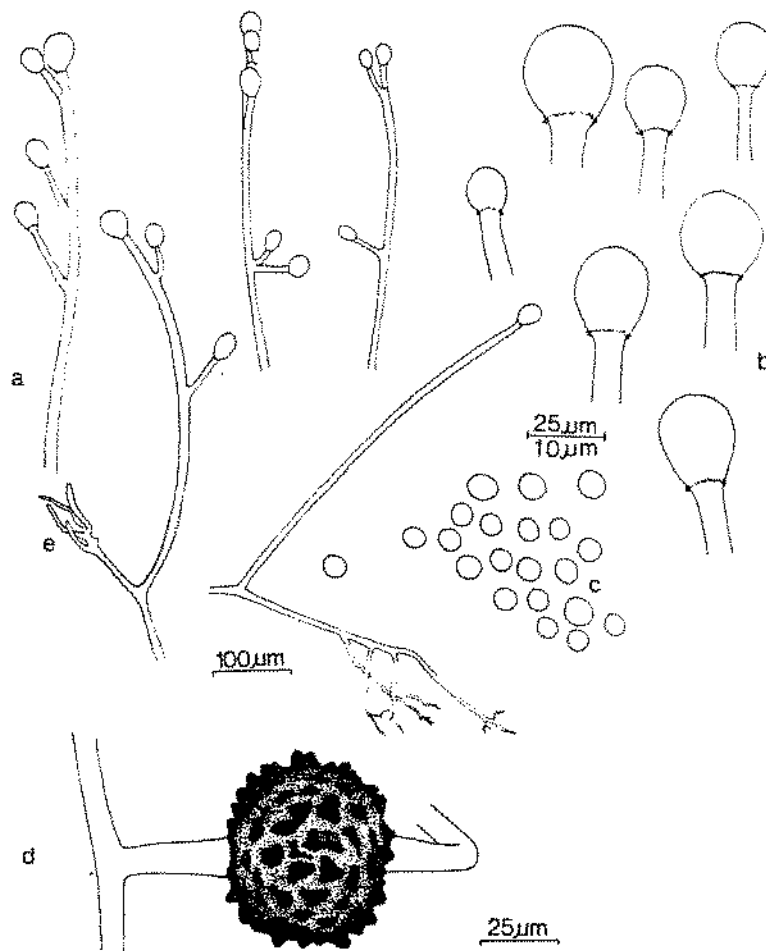


Figura 7. *Rhizomucor pusillus*, CBS 354.68. a. esporangióforos. b. columelas. c. esporos. d. zigósporo. e. rizóides. (SCHIPPER, 1978).

3.5.6. *Mortierella ramanniana* (Möller) Linnem.

O gênero *Mortierella* pertencia à família Mucoraceae, mas por apresentar esporângios sem columela e outras características distintas às de *Mucor* foi transferido para a família Mortierellaceae. Estes esporângios podem se apresentar com vários, poucos ou um único esporo, definidos algumas vezes como esporangíolos, especialmente quando se apresentam com um ou dois esporos (DOMSCH *et alii*, 1980).

Mortierella pode ser dividido em dois subgêneros, *Mortierella* e *Micromucor*, diferenciados entre si por suas características morfológicas (DOMSCH *et alii*, 1980) e também por seus perfis de ácidos graxos, como já foi verificado por AMANO *et alii* (1992). Este gênero é comum em climas frios e temperados (DOMSCH *et alii*, 1980), apresentando um perfil de ácidos graxos característico a este ambiente.

O subgênero *Micromucor* reúne espécies que apresentam características semelhantes a *Mucor*. A espécie cosmopolita, *Mortierella ramanniana* (Möller) Linnem., foi acomodada neste subgênero por apresentar columela, embora pequena. A presença da columela já fez com que fosse descrita como *Mucor ramannianus* Möller. Seus esporangióforos se apresentam simples ou ramificados (Figura 8) (DOMSCH *et alii*, 1980).

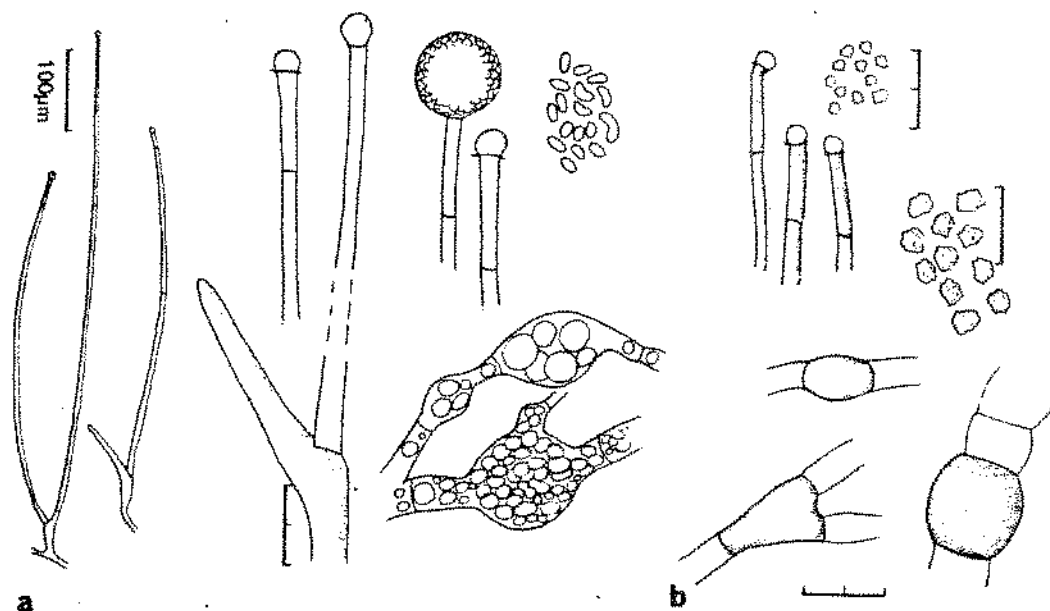


Figura 8. a. *Mortierella ramanniana* var. *ramanniana* CBS 219.47. detalhe das extremidades de esporangióforos com columela e esporos, e clamidósporos. b. *Mortierella ramanniana* var. *angulispora* CBS 603.68. extremidade de esporangióforos, esporos e clamidósporos (DOMSCH *et alii*, 1980).

Várias espécies de *Mortierella* têm sido estudadas intensamente devido à sua grande produção de ácidos graxos poliinsaturados de cadeias longas, como o ácido γ -linolênico (18:3 ω 6), araquidônico (20:4 ω 6) e icosapentaenóico (20:5 ω 3). Assim como *Mucor*, *Mortierella* também é um fungo oleaginoso, e ambos podem ser uma fonte economicamente viável destes ácidos graxos (KENDRICK & RATLEDGE, 1992a).

O ácido γ -linolênico já vem sendo produzido por meio de processos fermentativos, a partir destes fungos. No entanto, para esta produção são necessárias condições de cultura adequadas que propiciem aumento da insaturação de seus ácidos graxos (HANSSON & DOSTÁLEK, 1988).

A influência da temperatura de cultivo na produção do ácido γ -linolênico foi observada em *Mortierella ramanniana* CBS 112.08, que produziu maior quantidade deste ácido graxo a 20°C (HANSSON & DOSTÁLEK, 1988). Em outro estudo foi observada maior produção do ácido graxo icosapentaenóico por representantes do gênero *Mortierella*, quando crescidos a 12 °C (SHIMIZU *et alii*, 1988).

3.5.7. *Benjaminiella youngii* P.M. Kirk

Os gêneros *Benjaminiella* e *Mycotypha* (Figuras 8 e 9 respectivamente) apresentam, como característica comum, o estado leveduriforme além do filamentoso, uma das características que os reúne na mesma família, Mycotyphaceae. São bastante distintos de *Mucor* (Figura 3) (BENNY *et alii*, 1985).

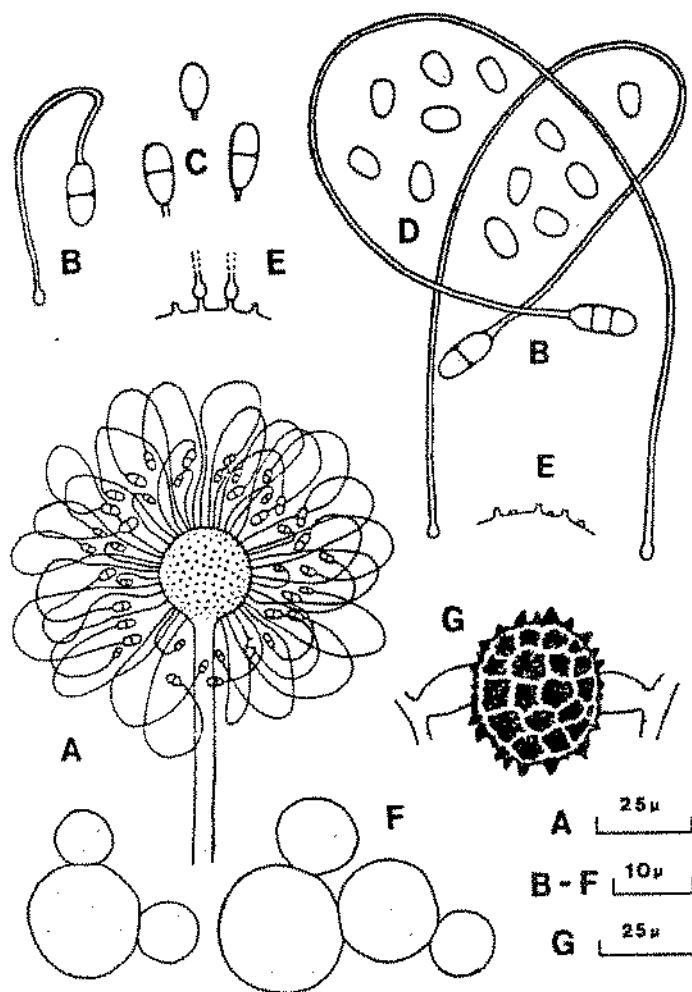


Figura 9. *Benjaminiella youngii* IMI 325629. a. esporangióforo. b. esporangíolo pedicelado. c. esporangíolos. d. esporos. e. segmento de vesícula fértil mostrando junção pedicelar. f. células tipo levedura. (KIRK, 1989).

Benjaminiella apresenta vesículas férteis globosas que sustentam esporângios monomórficos, através de longos e flexíveis pedicelos (KIRK, 1989; BENNY *et alii*, 1985). A espécie *Benjaminiella youngii* P.M. Kirk apresenta vesículas férteis lisas, geralmente globosas (Figura 9). Os pedicelos variam em tamanho e os esporângios possuem dois esporos, raramente um ou três esporos. Hifas sobre o substrato dão origem a células de brotamento tipo levedura, que são hialinas e globosas, com diâmetro máximo de 20 µm. Essa espécie foi isolada por P.M. Kirk de fezes de lagarto em região tropical.

3.5.8. *Mycotypha microspora* Fenner

O gênero *Mycotypha*, um fungo raro, é caracterizado morfológicamente pela presença de vesículas férteis cilíndricas que sustentam através de pedicelos curtos, esporângios dimórficos. As espécies de *Mycotypha* e *Benjaminiella* são prontamente diferenciadas pela forma da vesícula fértil, pelo comprimento dos pedicelos e se o esporângio se apresenta monomórfico ou dimórfico (BENNY *et alii*, 1985).

A espécie *Mycotypha microspora* Fenner apresenta vesículas férteis rugosas com formato cilíndrico, os quais podem se apresentar curtos ou compridos. Toda sua superfície, com exceção da extremidade superior, é recoberta por pedicelos curtos que sustentam esporângios, os quais possuem um único esporo. Hifas sobre o substrato dão origem a células de brotamento tipo levedura, com diâmetro máximo de 40 µm (Figura 10) (BENNY & BENJAMIN, 1976).

3.5.9. *Cunninghamella blakesleeana* Lendn.

O fungo sapróbio *Cunninghamella* é caracterizado por apresentar esporangióforos com ramificação verticilada ou pseudoverticilada. Os ramos e os esporangióforos terminam em vesículas globosas, que podem ser lisas ou rugosas devido a presença, sobre sua superfície, de dentículos que sustentam esporos (SAMSON, 1969).

A espécie *Cunninghamella blakesleeana* apresenta esporangióforos com ramos verticilados ou solitários, e vesículas com formatos que vão de subgloboso à clavado (Figura 11) (SAMSON, 1969). Segundo RATLEDGE (1982), representantes deste gênero, juntamente com alguns outros fungos Mucorales, são fungos oleaginosos.

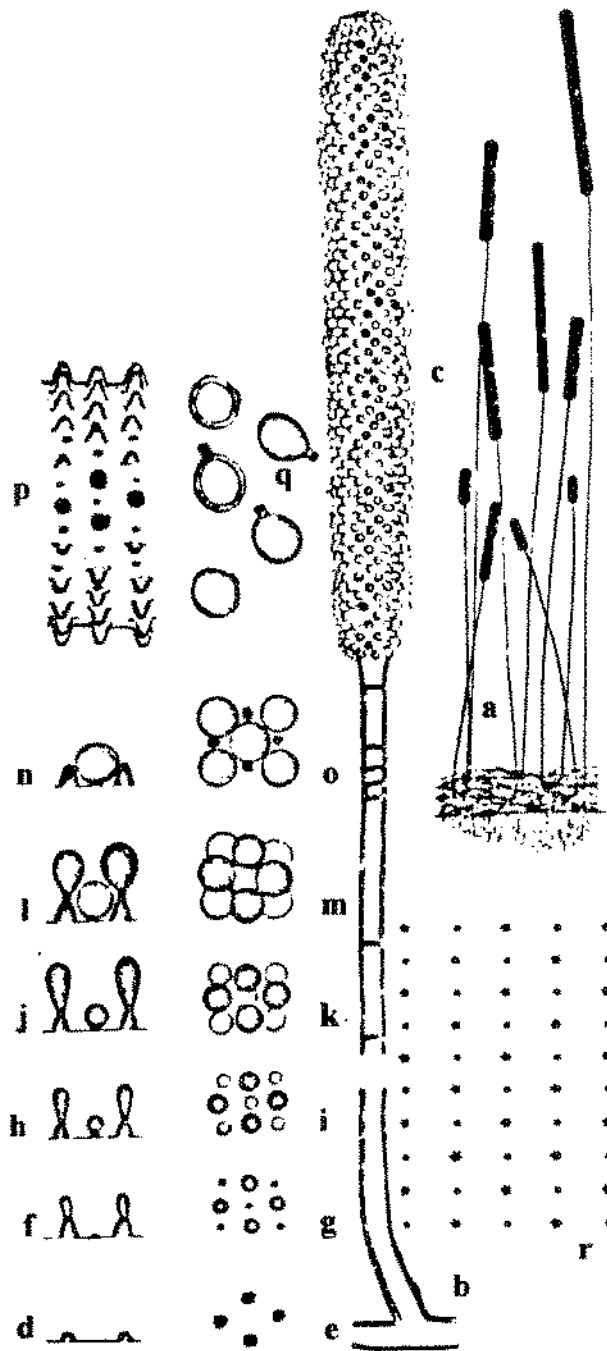


Figura 10. *Mycotypha microspora*. a. aspecto geral de esporangióforos. X 40. b. porção basal do esporangióforo. X 435. c. porção superior do esporangióforo sustentando vesícula fértil comprida. X 435. d-o. representação semidiagramática de estágios de desenvolvimento de esporângio, vistos lateralmente (d, f, h, j, l, n) e vistos de cima (e, g, i, k, m, o). X 1670. p. segmento de vesícula fértil. X 1670. q. esporângios subglobosos e obovóides. X 1.670. r. representação diagramática da superfície da vesícula fértil mostrando a relação de denticulos pedicelares longos (*) e curtos (•). (BENNY & BENJAMIN, 1976).

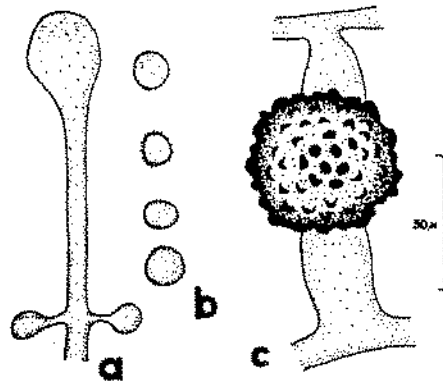


Figura 11. *Cunninghamella blakesleeana*. a. esporangióforo. b. esporos. c. zigósporo. X 250. (SAMSON, 1969).¹

3.5.10. *Volutella* Fr.

Volutella Fr. é a fase assexual do fungo *Nectria*, um Ascomicetos. É caracterizado pela presença de esporodóquios sésseis conspícuos ou talosos curtos (DOMSCH *et alii*, 1980). O esporodóquio é uma estrutura somática compacta, formada por hifas entrelaçadas que se apresentam em forma de almofada, coberta por conidióforos, nos quais se encontram os conídios, que são esporos (Figura 12) (GUERRERO & SILVEIRA, 1996).

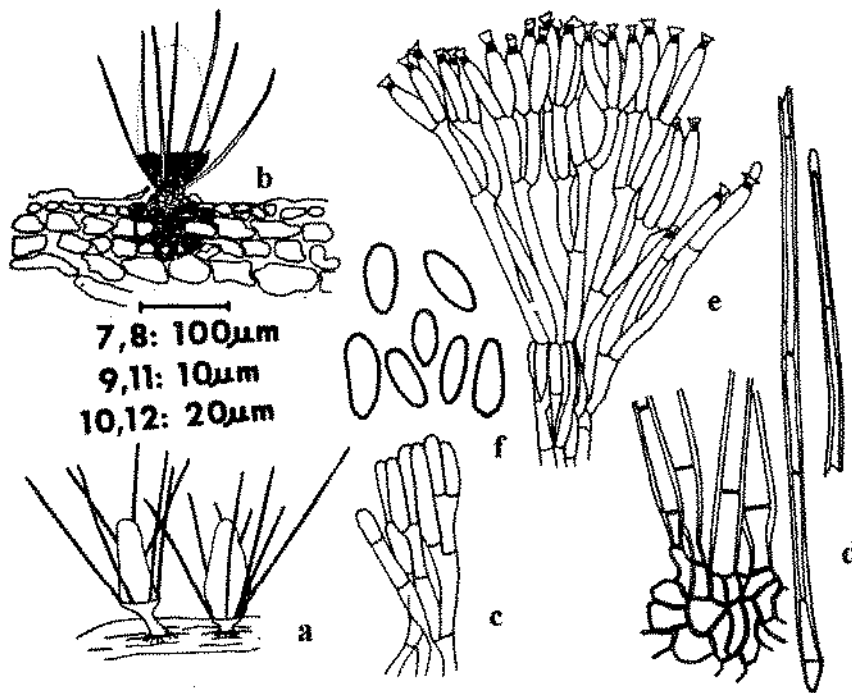


Figura 12. *Volutella* sp. a. esporodóquio. b. diagrama de secção longitudinal de esporodóquio. c. hifa marginal. d. setas. e. fiáides, células produtoras de esporos. f. conídios. (SAMUELS, 1977).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Culturas de Microrganismos

As linhagens estudadas (Tabela 3) foram adquiridas através da Coleção de Culturas Tropical, da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello".

Tabela 3. Linhagens de fungos utilizadas para a extração de ácidos graxos.

Zigomicetos

Backusella lamprospora (Lendner) Benny & R.K. Benj.

CCT 3480 < Pfenning, L.; = CBS 316.93; Belém PA, Brasil; raízes sob plantação anual.

Benjaminiella youngii P.M. Kirk

CCT 4121 <IMI 336111; Espanha; fezes de lagarto.

Circinella simplex van Tieghem

CCT 4260 <Pfenning, L.; Estação Ecológica Juréia-Itatins, Perufbe SP, Brasil; raiz de *Cariniana* sp.

Cunninghamella blakesleeana Lendner

CCT 4123 <IMI 200337 =CBS 133.27; Suíça.

Mortierella ramanniana (Möller) Linnem.

CCT 4428 <Baldini, S.; São Francisco de Paula RS, Brasil; raiz de *Araucaria angustifolia*.

Mucor circinelloides f. *janssenii* (Lendner) Schipper

CCT 4396.

Mycotypha microspora Fenner

CCT 4126 <IMI 282443; Lake Paijanne, Finlândia; fezes de rato.

CCT 4127 <IMI 108621; Nigéria; fezes de cavalo.

Rhizomucor miehei (Cooney & R. Emerson) Schipper

CCT 2236 <NRRL 3420 =ATCC 26282.

Rhizomucor pusillus (Lindt) Schipper

CCT 4133; Campinas SP, Shoyu.

Anamorfo

Volutella sp. Fr.

CCT 2995 <Attili, D.; Estação Ecológica Juréia-Itatins, Perufbe S.P., Brasil; solo sob floresta primária.

4.2. Metodologia de Extração e Análise de Ácidos Graxos

Foi seguida uma metodologia para extração de ácidos graxos originalmente aplicada a bactérias e leveduras, desenvolvida pela empresa MIDI de Newark, Del., o Microbial Identification System (MIS), na qual as condições de cultivo e os meios de cultura foram padronizados (SASSER, 1990). Esta metodologia foi modificada (no item 4.2.2.) para poder ser aplicada a fungos filamentosos. Os ácidos graxos extraídos na forma de FAMES foram analisados por cromatografia gás-líquida.

Tabela 4. Padrão de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) fornecido pela empresa Matreya, Inc. Lipids and Biochemicals, sob o número de catálogo 4232.

12:0	metil dodecanoato (laurato)
14:0	metil tetradecanoato (miristato)
15:0	metil pentadecanoato
16:0	metil hexadecanoato (palmitato)
16:1(9)	metil 9(Z)-hexadecenoato (palmitoleato)
17:0	metil heptadecanoato (margarato)
18:0	metil octadecanoato (estearato)
18:1(9)	metil 9(Z)-octadecenoato (oleato)
18:2(9,12)	metil 9,12(Z,Z)-octadecadienoato (linoleato)
18:3(6,9,12)	metil 6,9,12(Z,Z,Z)-octadecatrienoato (γ -linolenato)
19:0	metil nonadecanoato
20:0	metil icosanoato (arachidato)
20:1(11)	metil 11(Z)-icosenoato
20:2(11,14)	metil 11,14(Z,Z)-icosadienoato
20:3(8,11,14)	metil 8,11,14(Z,Z,Z)-icosatrienoato (homo- γ -linolenato)
20:4(5,8,11,14)	metil 5,8,11,14(Z,Z,Z,Z)-icosatetraenoato (arachidonato)
22:0	metil docosanoato (behenato)

Foi utilizado um padrão de FAMES que teve sua formulação feita a partir dos ácidos graxos mais comumente identificados em fungos pertencentes à ordem Mucorales. O padrão é constituído por 17 FAMES (Tabela 4).

4.2.1. Cultivo dos Fungos Filamentosos e Preparação de Biomassa

Foram reativadas as culturas liofilizadas vindas da Coleção de Culturas Tropical, em meio sólido Ágar Extrato de Malte e incubadas a 28°C (Tabela 5).

Tabela 5. Meio de cultura utilizado para preservação dos fungos.

Ágar Extrato de Malte	
Extrato de malte	20 g
Ágar	20 g
Água destilada q.s.p.	1 litro

Foram preparadas placas de Petri contendo meio sólido Ágar Batata Cenoura e frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml de meio líquido Caldo Saboraud Dextrose, numa quantidade equivalente a duas placas de Petri e um frasco Erlenmeyer para cada linhagem. Os meios de cultura utilizados foram autoclavados por 15 min a 110°C (Tabela 6).

Tabela 6. Meios de cultura utilizados para o crescimento dos fungos.

Ágar Batata Cenoura	
Batata	20 g
Cenoura	20 g
Ágar	17 g
Água destilada q.s.p.	1 litro

Caldo Saboraud Dextrose	
Glicose ou Dextrose	20 g
Peptona	10 g
Água destilada q.s.p.	1 litro

Do meio Ágar Extrato de Malte, após as linhagens chegarem ao crescimento adequado, cada linhagem foi inoculada nas duas placas de meio Ágar Batata Cenoura com o uso de um estilete estéril, inoculando a cultura na forma de um risco de cerca de 3 cm no centro da placa. Em seguida, as placas foram incubadas numa estufa de temperatura controlada em 28°C por 7 a 10 dias.

Usando o estilete estéril, uma pequena porção de micélio foi retirada da região entre a borda e o risco de inoculação destas placas inoculadas, e transferida para o frasco de Erlenmeyer de 250 ml, contendo o meio Caldo Saboraud Dextrose, no qual se deu a produção de biomassa.

Os frascos inoculados foram incubados em agitador rotatório a 28°C, a 150 rpm, por um período de 3 a 4 dias. Após 24 horas foi verificado o crescimento das culturas.

A coleta foi realizada quando as culturas estavam na sua fase de crescimento tardia ou estacionária, portanto apresentando um grande número de esferas formadas por micélio, ou apresentando o meio de cultura líquido com coloração opaca, no caso de crescimento em forma de levedura.

A biomassa, de cada cultura, foi coletada utilizando o filtro a vácuo e a membrana Milipore com 8µm de diâmetro de poro, com capacidade para retenção tanto de fungos apresentando micélio, como em forma de levedura.

A biomassa retida na membrana foi transferida para um tubo de vidro 16x150 mm com tampa de rosca, numa quantidade aproximada de 150 mg e em seguida liofilizada.

Após a liofilização, a biomassa foi transferida para um almofariz, macerada com o uso do pistilo juntamente com uma pequena porção de areia fina, previamente tratada através da lavagem com ácido clorídrico, que permitiu maior abrasão e portanto facilitou a trituração.

A trituração foi interrompida quando a biomassa estava reduzida a um pó fino, e então transferida de volta para o mesmo tubo onde tinha ocorrido a sua liofilização e onde foi realizado todo o processo de extração dos ácidos graxos, excluindo o último passo de limpeza da amostra.

Após cada trituração, o almofariz e o pistilo foram limpos cuidadosamente com o uso de um lenço de papel seco, para evitar a possibilidade da mistura de uma amostra por outra.

4.2.2. Reagentes, Extração e Derivatização dos Ácidos Graxos

Reagente 1 para saponificação: 45 g de hidróxido de sódio, 150 ml de metanol e 150 ml de água destilada.

Reagente 2 para metilação: 325 ml de ácido clorídrico 6,0 N e 275 ml de metanol. Esta mistura abaixou o pH da solução para menos de 1,5 e causou a metilação dos ácidos graxos, resultando no FAME, o qual é pouco solúvel na fase aquosa.

Reagente 3 para extração: 200 ml de hexano e 200 ml de éter metil t-butil. Este reagente fez com que os FAMES passassem para a fase orgânica, ou seja, a fase superior.

Reagente 4 para lavagem: 10,8 g de hidróxido de sódio em 900 ml de água destilada. Este procedimento reduziu a contaminação do injetor, da coluna e do detector.

Para utilizar estes reagentes após seu preparo, foi utilizado para cada um destes, um dispensador automático que garantiu reprodutibilidade e permitiu um maior número de extrações em menor tempo.

Para a extração dos ácidos graxos foram seguidas quatro etapas, incluindo saponificação, metilação, extração dos ésteres metílicos e lavagem, segundo o diagrama da Figura 13.

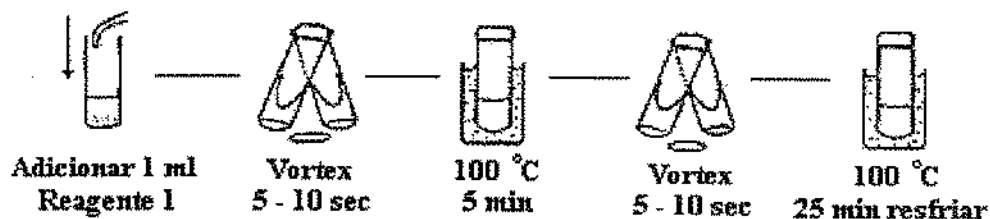
Saponificação. Foi adicionado 1,0 ml do reagente 1 aos tubos de extração, contendo a biomassa triturada. Em seguida foram agitados em vortex por 5 a 10 segundos e depois colocados em banho-maria, a 100 °C, por 5 min. Os tubos foram retirados deste banho-maria e resfriados à temperatura ambiente para então serem novamente agitados em vortex por 5 a 10 segundos e recolocados em banho-maria, a 100 °C, por mais 25 min, e em seguida resfriados à temperatura ambiente.

Metilação. Após o processo de saponificação, foi adicionado aos tubos 2,0 ml do reagente 2 e em seguida agitados em vortex, por 5 a 10 segundos. Foram colocados em banho-maria, que estava regulado rigorosamente a 80°C, com variação máxima de 1°C, por um tempo determinado de 10 min, também com variação máxima de 1 min. Após o banho-maria, os tubos foram resfriados rapidamente num tanque de gelo.

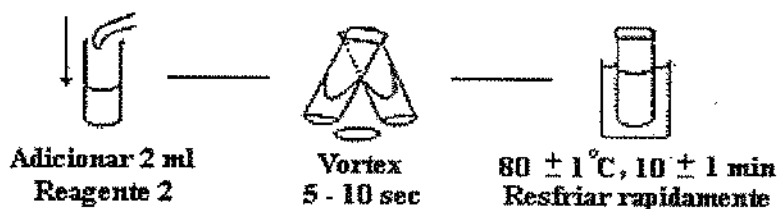
Coleta



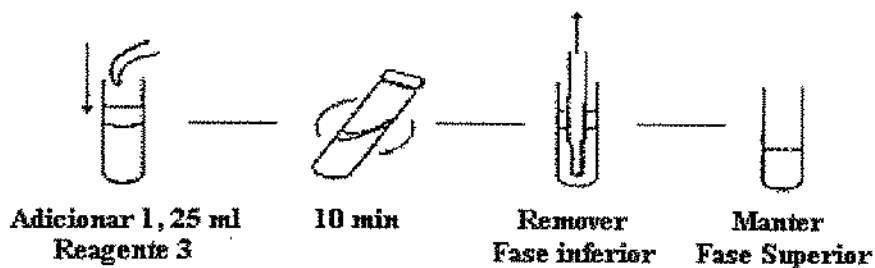
Saponificação



Metilação



Extração



Lavagem

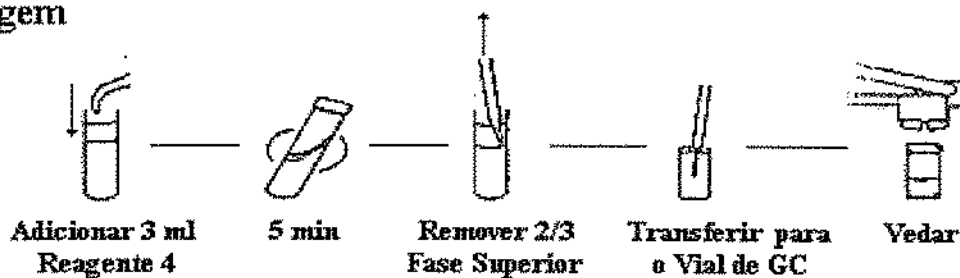


Figura 13. Protocolo para extração e derivatização de ácidos graxos (SASSER, 1990).

Extração. Foi adicionado aos tubos 1,25 ml do reagente 3 e em seguida foram colocados no agitador de tubos com agitação horizontal, por 10 min. Ocorreu uma visível separação em duas camadas. Dos tubos, a camada superior foi retirada com a ajuda de pipeta Pasteur descartável, e transferida para outro conjunto de tubos, enumerados da mesma forma que os primeiros tubos. Para facilitar esta etapa, a metodologia original foi modificada, na qual a camada inferior era retirada e descartada, desta forma, a etapa seguinte era realizada nos mesmos tubos.

Lavagem. Foi adicionado 3,0 ml do reagente 4 aos tubos do novo conjunto. Em seguida foram colocados no agitador de tubos com agitação horizontal, por 5 min. As soluções apresentaram novamente duas camadas bem definidas. Dos tubos, foram retirados 2/3 da camada superior onde estavam os FAMEs, com o uso de pipeta Pasteur descartável, e transferidos para pequenos tubos que acondicionaram as amostras com seus FAMEs extraídos, a baixas temperaturas.

4.2.3. Análise Cromatográfica dos FAMEs

As análises cromatográficas dos FAMEs foram realizadas no mesmo dia de extração e também nos dias consecutivos. Aqueles que não foram analisados no primeiro dia, foram conservados em congelador. As amostras foram analisadas o mais rápido possível para evitar perda ou alteração dos FAMEs. Antes das análises, as amostras foram reduzidas à secura total através do uso de gás nitrogênio e depois ressuspensos em 50 µl de hexano no mesmo tubo em que estavam inicialmente.

As análises dos FAMEs foram realizadas em um cromatógrafo a gás, marca Shimadzu, modelo GC-14A, equipado com um detector por ionização de chama (FID) e um injetor *split/splitless*. A coluna utilizada foi do tipo capilar, polar, OmegawaxTM 320, marca Supelco, com 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. O gás de arraste usado foi o hélio.

Os FAMEs analisados pelo cromatógrafo, foram registrados como picos pelo integrador, marca Shimadzu, modelo C-R4A Chromatopac, o qual mediu os tempos de retenção e as proporções relativas em % de cada um destes picos, expressa como uma proporção da área total.

Para se obter as condições cromatográficas ideais, ou seja, condições que resultassem em cromatogramas com picos bem definidos e separados, foram necessárias várias tentativas através

da variação das temperaturas, tempos e taxa de programação da coluna, além de algumas variações nas temperaturas do detector e injetor. As melhores condições encontradas estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Condições cromatográficas utilizadas para a análise dos FAMES extraídos dos fungos estudados.

Temperatura		<i>Split</i> <i>ratio</i> *	Condições para a coluna			Velocidade do gás carreador
injetor	detector		inicial	rampa	final	
250°C	250°C	40:1	160°C, 20 min	5°C/min → 200°C	200°C, 15 min	20 cm ³ s ⁻¹

*Razão de injeção.

Primeiramente foi injetado 1 µl do padrão de FAMES no cromatógrafo. Este padrão foi injetado somente uma vez ao dia, logo no início das análises. Após a análise do padrão, foram injetados as amostras. O volume de injeção das amostras foi de 2 µl.

A primeira amostra foi injetada em triplicata, sendo que a segunda injeção foi realizada após a metade das análises e a terceira no final das análises. Este procedimento teve como intuito o controle das possíveis variações ocorridas no cromatógrafo ao longo do dia.

Os ácidos graxos na forma de seus ésteres metílicos, ou seja, os FAMES, foram identificados a partir da comparação dos seus tempos de retenção em relação ao tempo de retenção dos FAMES do padrão.

Inicialmente a área mínima dos picos utilizada pelo integrador para identificar os ácidos graxos foi 600. Após a análise completa, foram refeitos os cromatogramas alterando-se a área mínima de 600 para o equivalente a 1% da área total obtida inicialmente.

Os cromatogramas, portanto, foram restringidos aos picos mais significativos, os quais tiveram suas proporções relativas recalculadas com base em uma nova área total calculada a partir destes picos.

4.2.4. Análise de Dados

Os dados cromatográficos relativos à ocorrência dos diferentes ácidos graxos foram colocados numa planilha de cálculo (EXCELL, versão 5.0; Microsoft Co., USA), de modo que as colunas correspondessem aos ácidos graxos e as linhas aos fungos analisados, utilizando um sistema de registro binário (0/1). Assim, a presença de um determinado ácido graxo para um dado fungo era marcada com o código 1 e a ausência com o código 0.

A matriz binária foi analisada usando o programa NTSYS-pc versão 1.40 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System; Exeter Publishing. LTD). O programa, originalmente criado para a taxonomia numérica (ROHLF, 1988), apresenta rotinas específicas para a realização de cálculos de similaridade para dados binários e confecção de dendrogramas a partir de matrizes das similaridades resultantes.

O coeficiente de Jaccard (SJ) foi empregado para a análise dos ácidos graxos, resultando em uma matriz de similaridade diagonal. Os agrupamentos de fungos foram obtidos a partir da utilização do algoritmo de UPGMA (*unweighted pair group method of arithmetic means*) e os *clusters* (do inglês, grupos ou agrupamentos) resultantes visualizados em um dendrograma de acordo com a porcentagem de similaridade entre os perfis.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extrações de Ácidos Graxos

As extrações de ácidos graxos de fungos (Tabela 3) na forma de FAMES, realizadas segundo a metodologia descrita anteriormente, foram analisadas no mesmo dia da extração e em dias consecutivos a esta (Tabela 8).

A primeira, segunda e terceira análise de cada linhagem indicadas, respectivamente por 1, 2 e 3 estão representadas na Tabela A1 (Anexo) e Figuras 14 a 25. No entanto, as análises de FAMES de algumas linhagens ficaram limitadas a apenas duas repetições devido a problemas de extração.

Tabela 8. Datas de extração e análise cromatográfica dos FAMES.

Extrações	Análises
Primeira extração: 11 de abril de 1996	11 / 12 / 13 abril de 1996
Segunda extração: 18 de abril de 1996	18 / 20 de abril de 1996
Terceira extração: 01 de maio de 1996	01 / 02 / 03 de maio de 1996

5.2. Análise Cromatográfica de FAMES

Um total de vinte FAMES foram detectados nos cromatogramas das extrações de ácidos graxos dos fungos estudados. Os FAMES extraídos e respectivos tempos de retenção (mínimo e máximo) estão listados na Tabela 9. Destes, 10 corresponderam a ácidos graxos não-identificados por possuírem tempos de retenção que não correspondiam ao dos FAMES presentes no padrão utilizado (Tabela 6). Os FAMES não-identificados foram referenciados de acordo com seu tempo de retenção. O FAME1 correspondeu ao de menor tempo de retenção e FAME10 ao de maior. Apesar de não-identificados, estes ácidos graxos foram utilizados para a caracterização dos fungos dos quais foram extraídos, juntamente com os FAMES identificados, resultando em perfis mais informativos para as linhagens.

Os FAMES restantes foram identificados segundo a metodologia descrita anteriormente e correspondem aos seguintes ácidos graxos: láurico, 12:0; mirístico, 14:0; palmítico, 16:0; palmitoléico, 16:1(9); esteárico, 18:0; oléico, 18:1(9); linoléico, 18:2(9,12); γ -linolênico, 18:3(6,9,12); icosadienóico, 20:2(11,14) e beênico, 22:0. Cromatogramas característicos correspondentes às análises das linhagens estão ilustrados nas Figuras A1 a A13 (Anexo).

Tabela 9. Ácidos graxos identificados e não identificados com a variação dos seus tempos de retenção.

Ácidos graxos	Nome comum	Tempos de retenção (t_R , minutos) (min – max)
12:0	Ácido láurico	3,16 – 3,18
14:0	Ácido mirístico	5,48 – 5,51
FAME1		10,26 – 10,36
16:0	Ácido palmítico	10,70 – 10,81
16:1(9)	Ácido palmitoléico	11,67 – 11,76
FAME2		14,68 – 14,80
FAME3		16,53 – 16,61
FAME4		21,13 – 21,26
18:0	Ácido esteárico	21,98 – 22,04
18:1(9)	Ácido oléico	22,76 – 22,96
FAME5		24,25 – 24,35
18:2(9,12)	Ácido linoléico	24,79 – 24,91
FAME6		25,75 – 25,86
18:3(6,9,12)	Ácido γ -linolênico	25,91 – 26,02
FAME7		27,13 – 27,24
FAME8		27,92 – 28,28
FAME9		28,89 – 28,98
20:2(11,14)	Ácido icosadienóico	32,32 – 32,44
22:0	Ácido beênico	32,74 – 33,16
FAME10		36,72 – 36,90

5.2.1. *Mucor circinelloides* f. *janssenii* CCT 4396

Os ácidos graxos extraídos e identificados de *Mucor circinelloides* f. *janssenii* CCT 4396 foram 14:0, 16:0, 16:1, 18:1, 18:2, 18:3 ω 6 e 20:2, e os não identificados foram FAME4, FAME5, FAME7, FAME9 e FAME10 (Figura 14). Destes, os ácidos graxos 18:1 e 18:3 ω 6 (ácido γ -linolênico) foram extraídos numa alta proporção relativa, 18,3% e 20,8%, respectivamente (Tabela 11).

M. circinelloides f. *janssenii* CCT 4396 apresenta-se, depois de *Benjaminiella youngii* CCT 4121, como o maior produtor do ácido graxo γ -linolênico ao ser comparado com os demais fungos analisados. *Benjaminiella youngii* CCT 4121 produziu 30,5% do ácido γ -linolênico (item 5.2.7.).

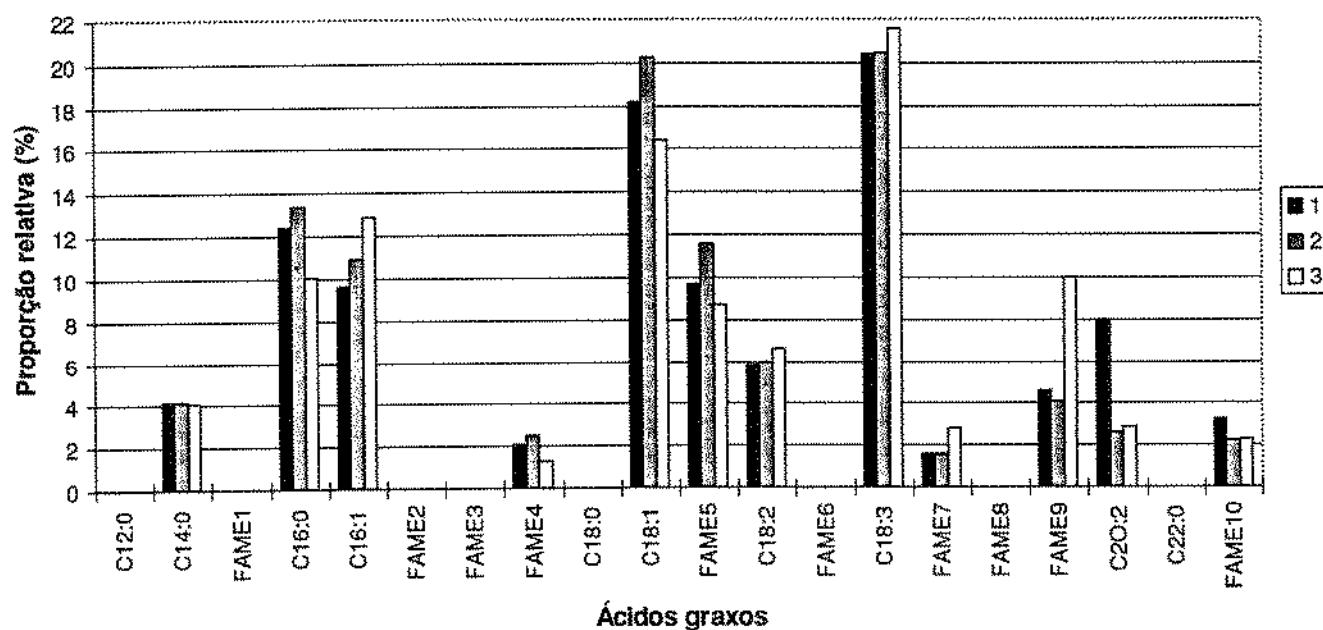


Figura 14. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de *Mucor circinelloides* f. *janssenii* de acordo com as três repetições, cujas análises foram realizadas em 12/04/96 (1), 18/04/96 (2) e 02/05/96 (3).

WESTHUIZEN *et alii* (1994) realizaram análises de ácidos graxos do fungo *Mucor circinelloides* CBS 478.70 e obtiveram um perfil de ácidos graxos semelhante ao de *Mucor circinelloides* f. *janssenii* CCT 4396. No entanto, dos ácidos graxos identificados em *M. circinelloides* f. *janssenii*

CCT 4396, o 20:2 (4,5%) não está presente no perfil de *Mucor circinelloides* CBS 478.70, e o 18:0 (4,11%) presente neste último, não foi extraído da linhagem CCT 4396.

Na investigação realizada por KENDRICK & RATLEDGE (1992b), outra linhagem do mesmo fungo, *Mucor circinelloides* CBS 108.16, apresentou um perfil de ácidos graxos semelhante ao da linhagem CBS 478.70 analisada por WESTHUIZEN *et alii* (1994).

5.2.2. *Backusella lamprospora* CCT 3480

O perfil de ácidos graxos de *Backusella lamprospora* CCT 3480 apresenta todos os FAMES identificados nos demais fungos analisados, incluindo 12:0, 14:0, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:2 e 22:0. A presença de 22:0 foi exclusiva desta linhagem e das linhagens das duas espécies de *Rhizomucor* estudadas. Os FAMES não identificados foram FAME1, FAME2, FAME4, FAME7, FAME9 e FAME10 (Figura 15). Quatro FAMES apresentaram altas proporções relativas, 16:0 (17,65%), 18:1 (14,65%), 18:2 (11,3 %) e 18:3 (18,75%) (Tabela 11).

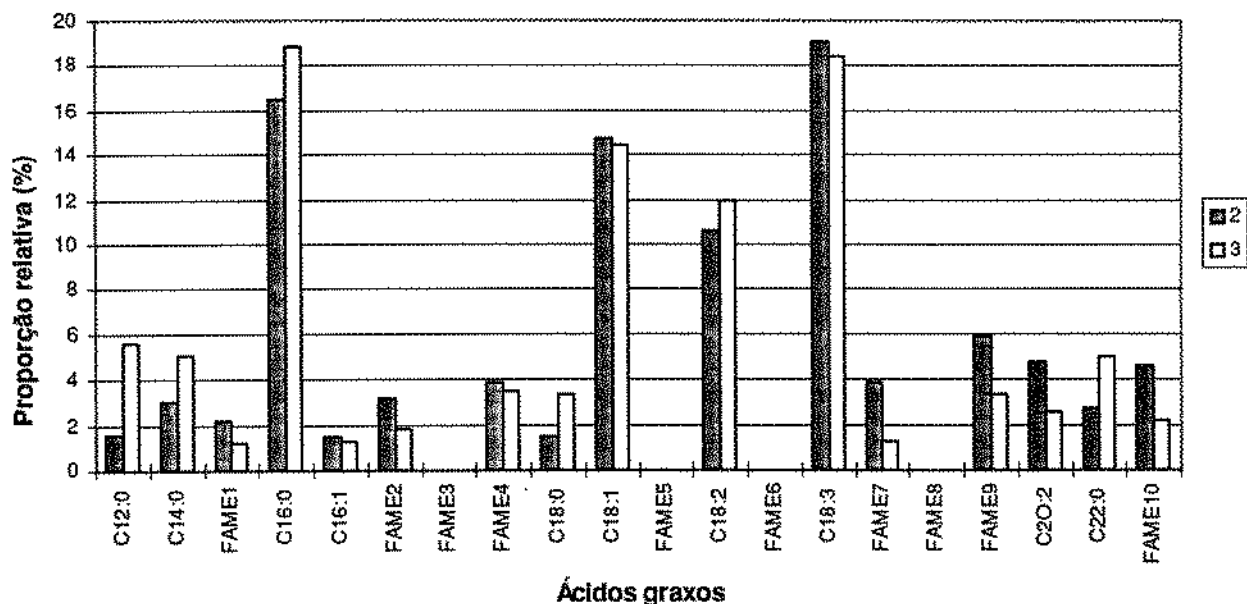


Figura 15. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de *Backusella lamprospora* de acordo com as duas repetições, cujas análises foram realizadas em 18/04/96 (2) e 02/05/96 (3).

5.2.3. *Circinella simplex* CCT 4260

O perfil de ácidos graxos de *Circinella simplex* CCT 4260 é composto por 12:0, 14:0, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3 ω 6 e 20:2 e pelos ácidos graxos não identificados FAME2, FAME4, FAME6, FAME7, FAME9 e FAME10 (Figura 16).

Circinella simplex e *Mucor circinelloides* f. *janssenii*, embora apresentando certas características em comum, possuem diferenças morfológicas que permitiram a sua acomodação em gêneros distintos (Figuras 3, 5). Os perfis de ácidos graxos obtidos das linhagens *Circinella simplex* CCT 4260 e *Mucor circinelloides* f. *janssenii* CCT 4396 poderiam ser utilizados como critério taxonômico adicional à morfologia para comprovar a distância taxonômica existente entre estas duas espécies, como se observa no dendrograma (Figura 26).

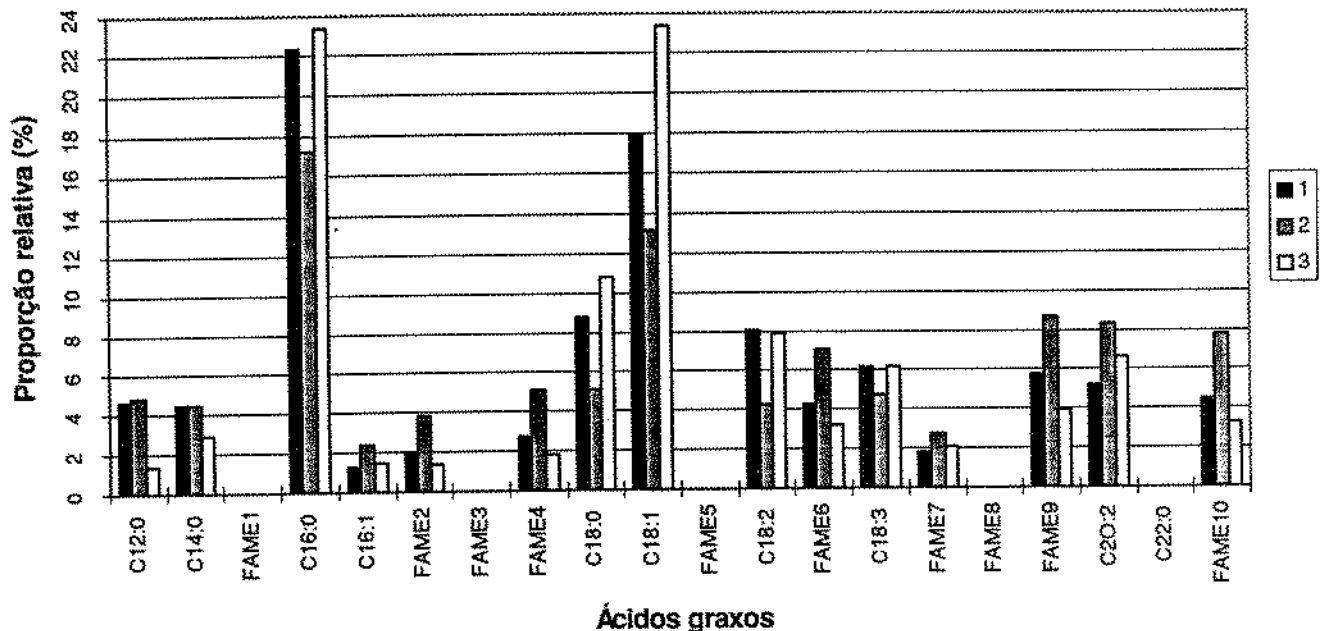


Figura 16. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de *Circinella simplex* de acordo com as três repetições, cujas análises foram realizadas em 12/04/96 (1), 18/04/96 (2) e 02/05/96 (3).

5.2.4. *Rhizomucor miehei* CCT 2236

Rhizomucor miehei CCT 2236 foi caracterizado por um perfil de ácidos graxos composto por 16:0, 16:1, 18:1, 18:2, 18:3 ω 6, 20:2 e 22:0, e pelos ácidos graxos não identificados FAME1, FAME2, FAME4, FAME6, FAME7, FAME8, FAME9 e FAME10 (Figura 17).

Duas outras linhagens de *Rhizomucor miehei* foram analisadas em estudos distintos (SUMNER & MORGAN, 1969; e WESTHUIZEN *et alii*, 1994). Ambos identificaram cinco dos ácidos graxos encontrados na linhagem *Rhizomucor miehei* CCT 2236, sendo eles: 16:0, 16:1, 18:1, 18:2 e 18:3 ω 6. Estes foram extraídos, no presente estudo, em proporções relativas de 5,7%, 1,45%, 7,15%, 7,55% e 5,7%, respectivamente (Tabela 11). Os ácidos graxos 14:0 e 18:0, identificados por WESTHUIZEN *et alii* (1994) na linhagem CBS 182.67T e por SUMNER & MORGAN (1969), não foram detectados na linhagem em estudo. Por outro lado, a presença dos ácidos graxos 20:2 e 22:0 na linhagem CCT 2236, extraídos em proporções relativas maiores do que os demais ácidos graxos identificados, 8,1% e 13,75%, respectivamente, não foi determinada no trabalho realizado por WESTHUIZEN *et alii* (1994). O padrão utilizado por SUMNER & MORGAN (1969) não continha tais ácidos graxos (Tabela 11, Figura 17).

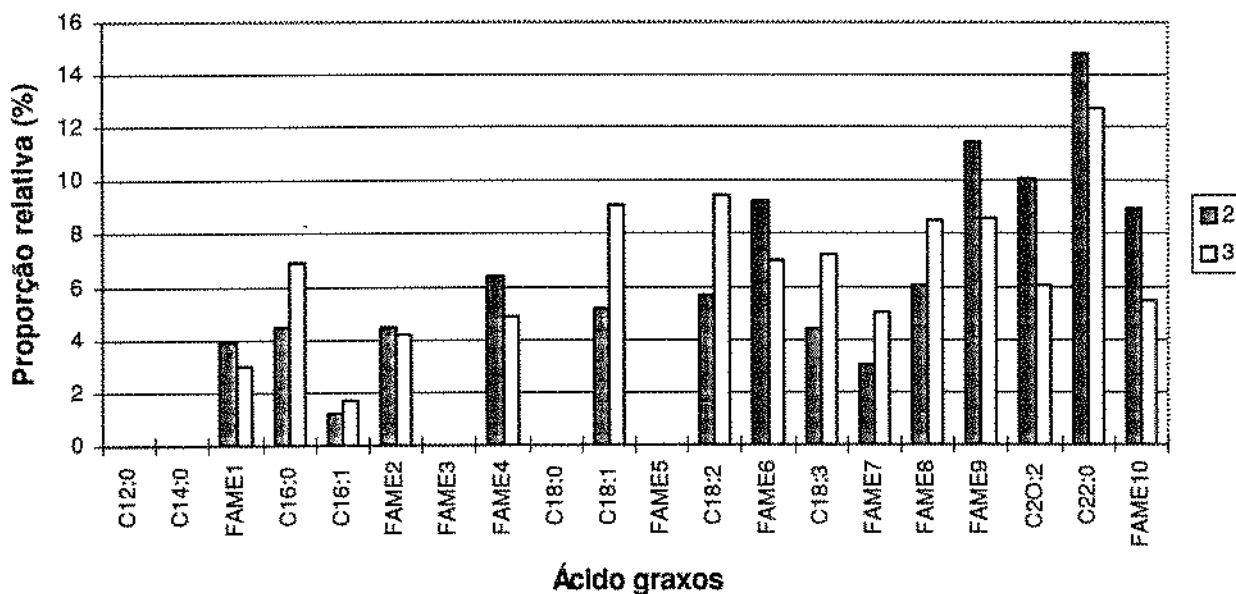


Figura 17. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de *Rhizomucor miehei* de acordo com as duas repetições, cujas análises foram realizadas em 18/04/96 (2) e 01/05/96 (3).

5.2.5. *Rhizomucor pusillus* CCT 4133

Foram extraídos de *Rhizomucor pusillus* CCT 4133 os ácidos graxos 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3 ω 6, 20:2 e 22:0, e os não identificados FAME1, FAME2, FAME4, FAME6, FAME7, FAME8, FAME9 e FAME10 (Figura 18).

A presença dos ácidos graxos 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2 e 18:3 em *Rhizomucor pusillus* CCT 4133, extraídos em proporções relativas de 14,75%, 1,55%, 2,6%, 14,15%, 14,3% e 3,25% respectivamente (Tabela 11), já havia sido verificada pelas análises realizadas por SUMNER & MORGAN (1969), MUMMA *et alii* (1971) e WESTHUIZEN *et alii* (1994).

Da mesma forma que ocorreu com a linhagem *Rhizomucor miehei* CBS 182.67T analisada por WESTHUIZEN *et alii* (1994), as várias linhagens de *Rhizomucor pusillus* estudadas por estes autores não apresentaram os ácidos graxos 20:2 e 22:0, os quais foram identificados em *R. pusillus* CCT 4133 em proporções relativas de 4,55% e 12,2% respectivamente (Tabela 11, Figura 18). MUMMA *et alii* (1971) utilizaram um padrão que não continha tais ácidos graxos, assim como SUMNER & MORGAN (1969).

As linhagens *Rhizomucor pusillus* CCT 4133 e *Rhizomucor miehei* CCT 2236 podem ser diferenciadas com base em seus perfis de ácidos graxos apenas pelo ácido graxo 18:0, ausente neste último (Figuras 17, 18). Os resultados deste estudo não estão de acordo com aqueles encontrados por SUMNER & MORGAN (1969) e por WESTHUIZEN *et alii* (1994), os quais identificaram este ácido graxo em linhagens de *Rhizomucor miehei*.

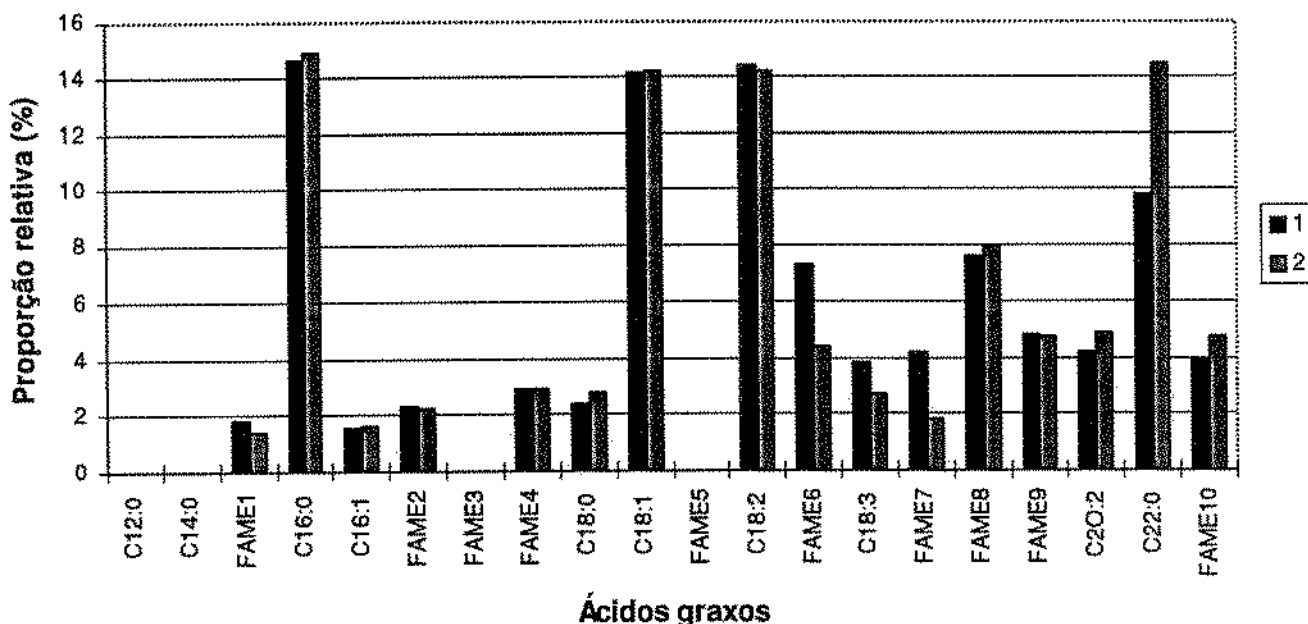


Figura 18. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de *Rhizomucor pusillus* de acordo com as duas repetições, cujas análises foram realizadas em 11/04/96 (1) e 18/04/96 (2).

Os perfis de ácidos graxos de *Rhizomucor pusillus* CCT 4133 e de *Rhizomucor miehei* CCT 2236 estão coerentes com perfis de fungos termófilos (MUMMA *et alii*, 1971; HAMMONDS & SMITH, 1986), pois são constituídos por ácidos graxos saturados e monoinsaturados em altas proporções relativas. Além disso, apresentam ácidos graxos de cadeias longas, exemplificados pela presença em alta proporção relativa e quase exclusiva do ácido graxo 22:0, sendo 12,2% para a linhagem CCT 4133 e 13,75% para a linhagem CCT 2236, e ausência de ácidos graxos de cadeias curtas, como 12:0 e 14:0 (Tabela 11, Figuras 17, 18). O ácido graxo 22:0 também ocorre em *Backusella lamprospora*, mas em menor proporção relativa, 3,85% (Tabela 11).

5.2.6. *Mortierella ramanniana* CCT 4428

A linhagem *Mortierella ramanniana* CCT 4428 foi caracterizada pelo perfil de ácidos graxos identificados 14:0, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3 ω 6 e 20:2 e pelos não identificados FAME2, FAME4, FAME6, FAME7, FAME9 e FAME10 (Tabela10, Figura 19).

WESTHUIZEN *et alii* (1994) analisaram a linhagem CBS 243.58 e identificaram os ácidos graxos 14:0, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3 ω 6, 20:0, 20:1, 20:2 e 20:4. Este perfil se assemelha ao da linhagem CCT 4428, exceto pela presença dos ácidos da série de 20 carbonos, pois a linhagem CCT 4428 apresentou apenas 20:2 (Tabela 6).

SUMNER & MORGAN (1969) obtiveram resultados semelhantes em análises realizadas com a linhagem IMI 35044a, exceto pela ausência dos ácidos graxos com cadeia de 20 carbonos no perfil desta linhagem, já que o padrão utilizado não incluía estes.

AMANO *et alii* (1992) estudaram o significado quimiotaxonômico do perfil de ácidos graxos para o gênero *Mortierella* ao diferenciarem representantes dos subgêneros *Micromucor* e *Mortierella* pela presença de FAMES com 20 carbonos neste último grupo. Estes dois subgêneros podem ser distinguidos por suas características morfológicas e de cultivo em placa (GAMS, 1977, citado por AMANO *et alii*, 1992). A partir destas observações, AMANO *et alii* (1992) constataram que as diferenças no perfil de ácidos graxos apresentadas pelos dois subgêneros coincidia com as diferenças nas características morfológicas e de cultivo em placa.

Dentre as várias espécies de *Mortierella* estudadas por AMANO *et alii* (1992), estão várias linhagens de *Mortierella ramanniana*, pertencentes ao subgên. *Micromucor*. Os ácidos graxos poliinsaturados de 20 carbonos se mostraram caracteristicamente ausentes nestas linhagens, o que

contraria os resultados obtidos através das análises realizadas para a linhagem CCT 4428 neste estudo, assim como aqueles encontrados por WESTHUIZEN *et alii* (1994) para a linhagem CBS 243.58.

Mortierella ramanniana, um fungo de climas frios e temperados, apresenta um perfil de ácidos graxos compatível com os perfis observados para fungos psicrófilos, os quais apresentam maior insaturação nos seus ácidos graxos quando comparados com perfis de fungos mesófilos e termófilos (HAMMONDS & SMITH, 1986). Os termófilos são exemplificados pelas espécies do gênero *Rhizomucor*.

A linhagem *Mortierella ramanniana* CCT 4428, sendo um fungo psicrófilo, apresentou uma proporção relativa do ácido γ -linolênico inferior ao que seria esperado (7,45%), principalmente ao ser comparada com as de *Mucor circinelloides f. janssenii* CCT 4396 e de *Benjaminiella youngii* CCT 4121, fungos mesófilos, cujas proporções relativas foram de 20,8% e 30,5%, respectivamente (Tabela 11).

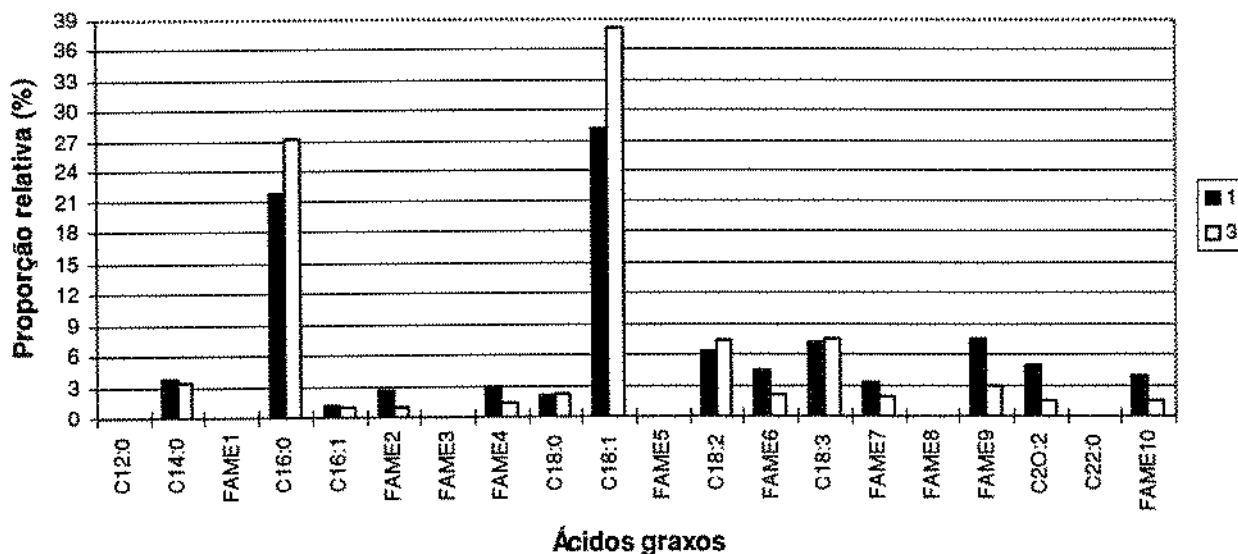


Figura 19. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de *Mortierella ramanniana* de acordo com as duas repetições, cujas análises foram realizadas em 13/04/96 (1) e 02/05/96 (3).

5.2.7. *Benjaminiella youngii* CCT 4121

Um pequeno número de ácidos graxos foi extraído de *Benjaminiella youngii* CCT 4121, do qual os identificados foram 12:0, 14:0, 16:0, 18:1, 18:2 e 18:3 ω 6, e os não identificados foram FAME3, FAME5 e FAME9 (Figura 20).

Os ácidos graxos insaturados de 18 carbonos, 18:1, 18:2 e 18:3, foram produzidos por este fungo em altas proporções relativas, 28,7%, 19,8% e 30,5%, respectivamente. A proporção relativa do ácido graxo 18:3 encontrada neste fungo foi a maior dentre todos os fungos analisados (Tabela 11). O ácido graxo não identificado FAME3 foi extraído unicamente de *B. youngii* CCT 4121.

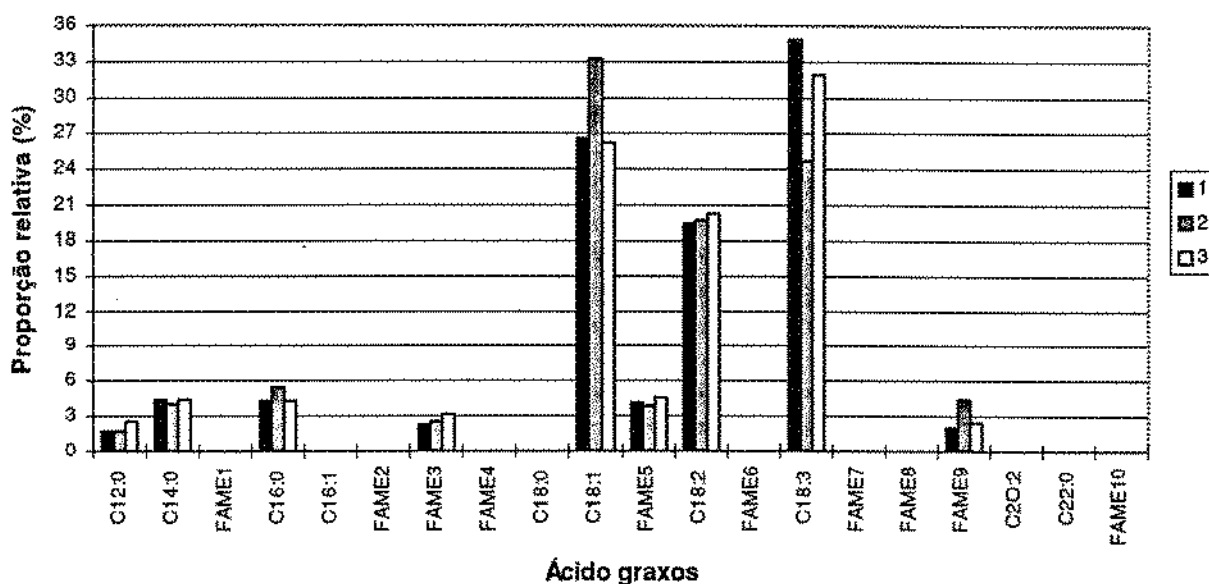


Figura 20. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de *Benjaminiella youngii* de acordo com as três repetições, cujas análises foram realizadas em 13/04/96 (1), 18/04/96 (2) e 03/05/96 (3).

5.2.8. *Mycotypha microspora* CCT 4126 e CCT 4127

Os ácidos graxos identificados em *Mycotypha microspora* CCT 4126 (A) foram 12:0, 14:0, 16:0, 16:1, 18:1, 18:2, 18:3 ω 6 e 20:2. Os não identificados foram FAME1, FAME2, FAME4, FAME6, FAME7, FAME9 e FAME10 (Figura 21).

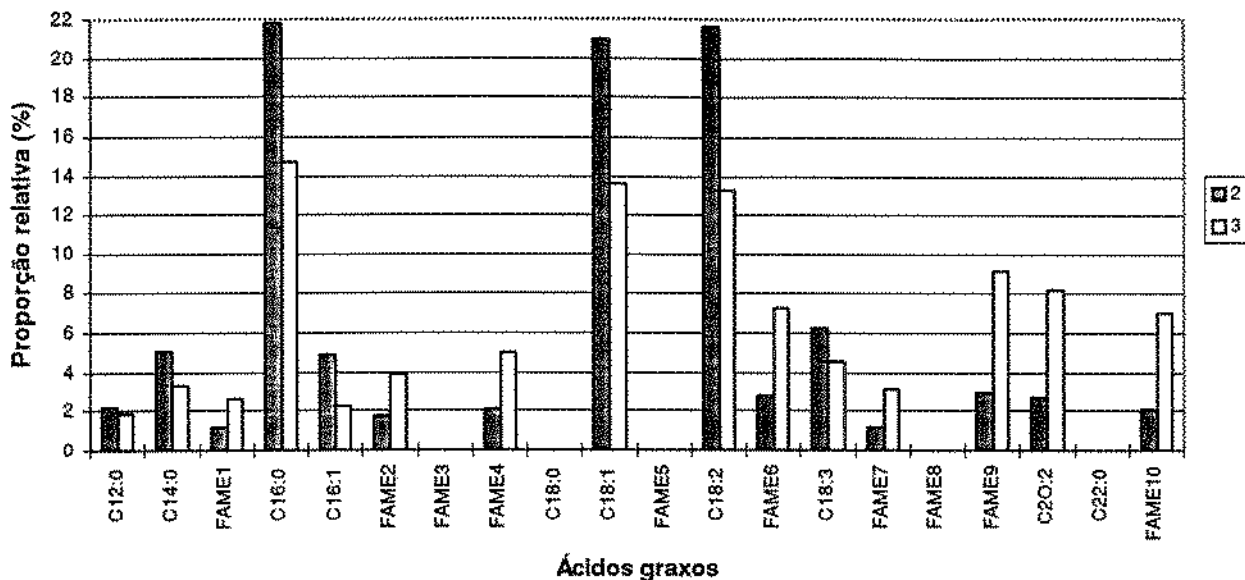


Figura 21. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de *Mycotypha microspora A* de acordo com as duas repetições, cujas análises foram realizadas em 20/04/96 (2) e 03/05/96 (3).

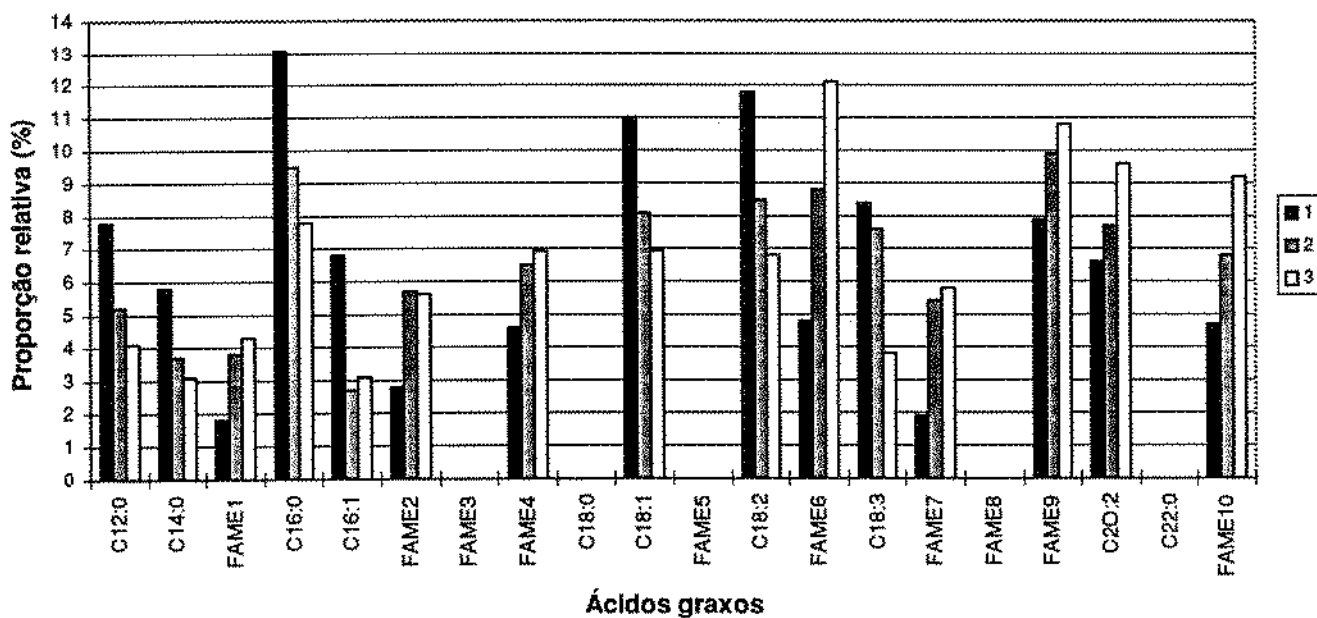


Figura 22. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de *Mycotypha microspora B* de acordo com as três repetições, cujas análises foram realizadas em 13/04/96 (1), 20/04/96 (2) e 03/05/96 (3).

Os ácidos graxos extraídos e identificados da linhagem *Mycotypha microspora* CCT 4127 (B) foram 12:0, 14:0, 16:0, 16:1, 18:1, 18:2, 18:3ω6 e 20:2 e os não identificados foram FAME1, FAME2, FAME4, FAME6, FAME7, FAME9 e FAME10 (Figura 22).

O perfil de ácidos graxos de *Mycotypha microspora* CCT 4127 foi o mesmo apresentado pela linhagem *Mycotypha microspora* CCT 4126 (Figuras 21, 22), embora as proporções relativas dos ácidos graxos diferissem. A linhagem CCT 4127 apresentou menor variação entre as proporções relativas dos ácidos graxos quando comparado com a linhagem CCT 4126, da qual foram obtidas altas proporções relativas dos ácidos graxos 16:0 (18,25%), 18:1 (17,3%) e 18:2 (17,5%) (Figuras 21, 22, Tabela 11).

5.2.9. *Cunninghamella blakesleeana* CCT 4123

A análise do perfil de ácidos graxos da linhagem *Cunninghamella blakesleeana* CCT 4123 foi realizada com repetição, ou seja, a partir de dois cultivos diferentes. O objetivo desta repetição foi avaliar a variabilidade do perfil de ácidos graxos em função da variação da cultura de um mesmo fungo. Esta repetição foi diferenciada nas Tabelas e Figuras pelo acréscimo da letra maiúscula A seguida de 1 e 2, portanto *Cunninghamella blakesleeana* A₁ e A₂.

Os perfis qualitativos de ácidos graxos apresentados por *Cunninghamella blakesleeana* A₁ e *Cunninghamella blakesleeana* A₂ foram idênticos, demonstrando não haver diferenciação no perfil de ácidos graxos apresentado pelas duas repetições da mesma linhagem. Os ácidos graxos extraídos e identificados foram 16:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:2, e os não identificados foram FAME1, FAME2, FAME4, FAME6, FAME7, FAME9 e FAME10 (Figuras 23, 24).

A presença dos ácidos graxos 16:0, 18:1, 18:2 e 18:3 na repetição da linhagem *Cunninghamella blakesleeana* CCT 4123 já havia sido observada através de análises realizadas por SHAW (1966a) para a linhagem IMI 6387, sendo que, além destes, também foram identificados os ácidos graxos 12:0, 14:0, 16:1 e 18:0, embora em baixas proporções relativas. O ácido graxo 20:2, presente na linhagem CCT 4123, não foi identificado na linhagem estudada por SHAW (1966a).

A Tabela 11 permite observar que, apesar de *Cunninghamella blakesleeana* A₁ e A₂ apresentarem perfis com uma composição qualitativa idêntica, houve pequenas variações nas proporções relativas dos FAMES, demonstrando a variabilidade na ocorrência semi-quantitativa dos ácidos graxos no perfil de uma mesma linhagem.

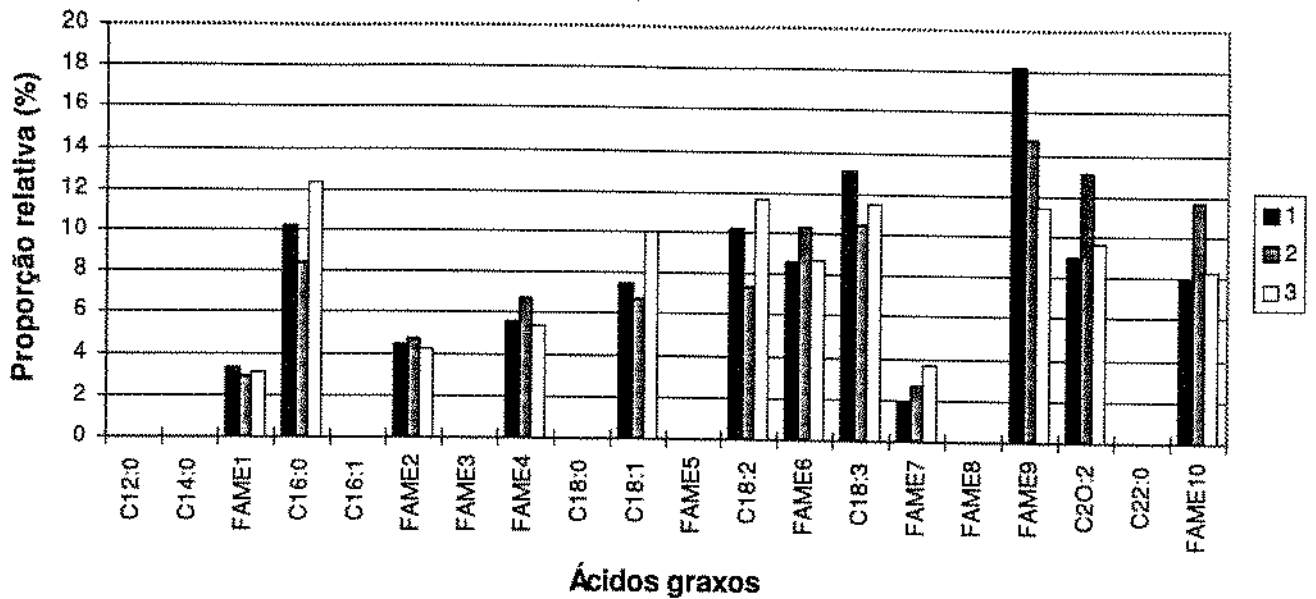


Figura 23. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de *Cunninghamella blakesleeana* A₁ de acordo com as três repetições, cujas análises foram realizadas em 11/04/96 (1), 18/04/96 (2) e 01/05/96 (3).

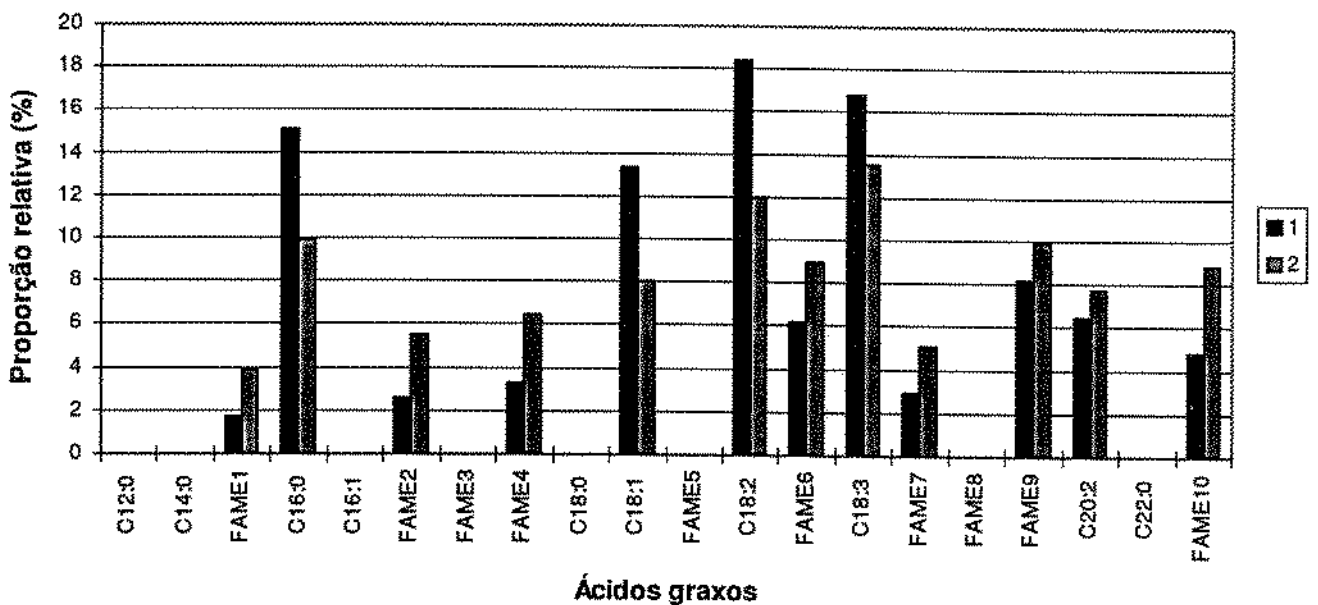


Figura 24. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de *Cunninghamella blakesleeana* A₂ de acordo com as duas repetições, cujas análises foram realizadas em 11/04/96 (1) e 18/04/96 (2).

5.2.10. *Volutella* sp. CCT 2995

Uma espécie do gênero *Volutella* (item 3.5.10) foi incluída no presente estudo como um organismo referência distinto dos representantes da classe Zigomicetos. Foram extraídos de *Volutella* sp. CCT 2995 os ácidos graxos identificados como 16:0, 18:0, 18:1 e 18:2(ω 6), e o não identificado FAME7 (Figura 25). Este fungo apresentou o menor número de ácidos graxos detectados e foi o único dentre os demais que não apresentou o ácido graxo 18:3(ω 6), ácido γ -linolênico característico dos fungos pertencentes aos Zigomicetos.

Estes resultados confirmam os estudos realizados por MÜLLER *et alii* (1994) que incluíam fungos pertencentes às classes Ascomicetos, Basidiomicetos e Oomicetos. Em geral, os ácidos graxos mais abundantes em fungos pertencentes aos Ascomicetos e Basidiomicetos são 16:0, 18:1 e 18:2(ω 6) (LÖSEL, 1988; JABAJI-HARE, 1988; MARTINEZ *et alii*, 1991; JOHNK & JONES, 1992).

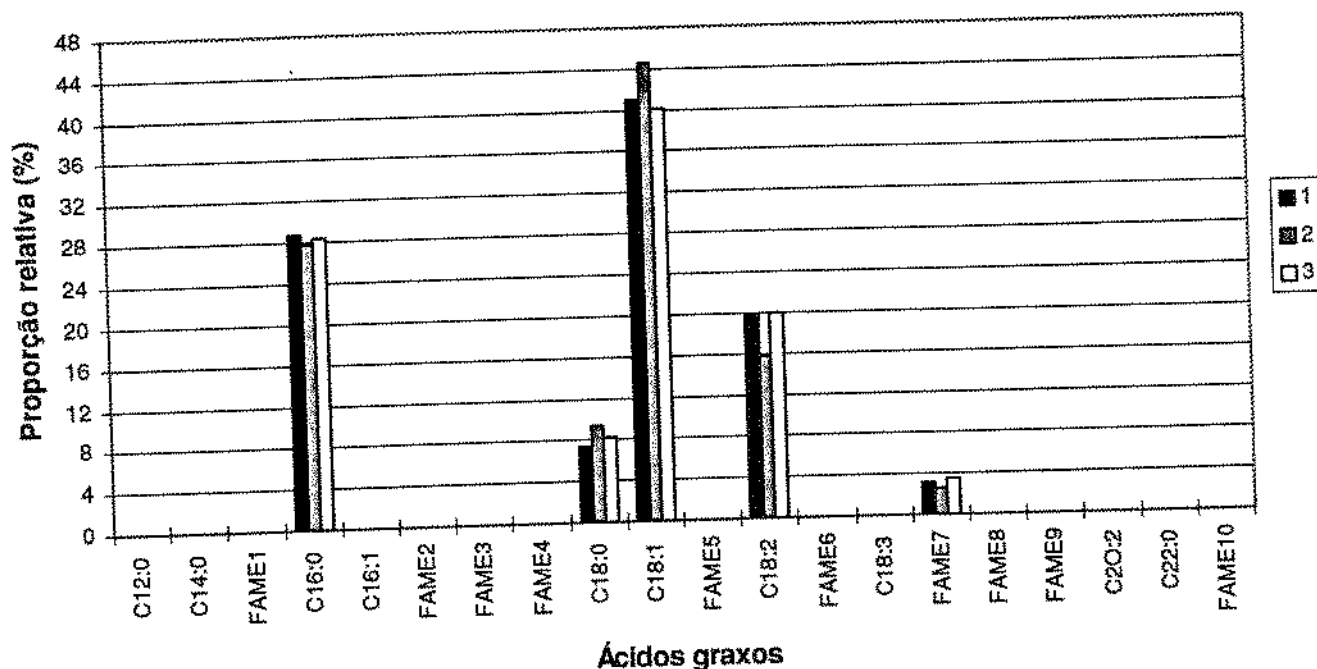


Figura 25. Perfil de ácidos graxos e suas proporções relativas (%) de *Volutella* sp. de acordo com as três repetições, cujas análises foram realizadas em 13/04/96 (1) 20/04/96 (2) e 03/05/96 (3).

Alguns Ascomicetos e seus anamorfos podem ser caracterizados pela presença do ácido graxo 18:3(ω 3), que não ocorre nos Zigomicetos, e outros por um perfil constituído apenas por ácidos graxos até 18:2(ω 6) (SHAW, 1966b; LECHEVALIER & LECHEVALIER, 1988; WESTHUIZEN *et alii*, 1994). A partir dos ácidos graxos identificados na linhagem de *Volutella* sp. CCT 2995, pode se observar que, como membro dos anamorfos de Ascomicetos, esta linhagem é caracterizada pela ausência de 18:3(ω 6), comprovando desta forma os estudos anteriores.

5.3. Classificação Quimiotaxonômica dos Fungos Analisados

A caracterização quimiotaxonômica dos fungos estudados foi realizada através da determinação do seu perfil qualitativo de ácidos graxos, a partir das análises em triplicata de FAMES extraídos em diferentes ocasiões. As linhagens foram também caracterizadas utilizando-se as proporções relativas (%) de cada componente em relação ao perfil total de FAMES para comparações semi-quantitativas dos perfis de ácidos graxos.

As Tabelas 10 e 11 apresentam os perfis qualitativo e semi-quantitativo, respectivamente, de ácidos graxos dos fungos analisados. Os dados da média das proporções relativas dos ácidos graxos (Tabela 11) foram baseados nos resultados das análises em triplicata (Tabela A1, Anexo).

Os perfis qualitativos de ácidos graxos das linhagens estudadas foram analisados numericamente através do coeficiente de similaridade de Jaccard e as relações entre as linhagens determinadas em um dendrograma de UPGMA utilizando o programa NTSYS (Figura 26).

A observação da Figura 26 evidencia a formação de dois *clusters*, um reunindo *Cunninghamella blakesleeana* CCT 4123 A₁ e B₂, *Rhizomucor miehei* CCT 2236 e *Rhizomucor pusillus* CCT 4133, e outro reunindo *Circinella simplex* CCT 4260, *Mortierella ramanniana* CCT 4428, *Mycotypha microspora* CCT 4126 e 4127 e *Backusella lamprospora* CCT 3480. Observa-se também que estes dois *clusters* reunidos formam um outro maior juntamente com *Mucor circinelloides* f. *jansenii* CCT 4396 em nível aproximado de 65% de similaridade. A partir da Tabela 10 verifica-se que esta linhagem apresenta ácidos graxos em seu perfil em comum com os perfis dos fungos reunidos neste *cluster*, e que a distância se deve à presença do ácido graxo FAME5, presente somente nesta linhagem e em *Benjaminiella youngii* (Figura 26, Tabela 10).

Cunninghamella blakesleeana CCT 4123 A₁ e B₂, *Rhizomucor miehei* CCT 2236 e *Rhizomucor pusillus* CCT 4133 estão reunidos num *cluster* em nível aproximado de 77% de similaridade devido à grande semelhança dos seus perfis de ácidos graxos (Figura 26). Estes fungos apresentam características que os distinguem dos demais. *Cunninghamella blakesleeana*, por exemplo, não apresenta columela (Figura 10), e *Rhizomucor miehei* e *Rhizomucor pusillus* são fungos termófilos.

O outro *cluster* foi formado por *Circinella simplex* CCT 4260, *Mortierella ramanniana* CCT 4428, *Backusella lamprospora* CCT 3480 e pelas duas linhagens *Mycotypha microspora* CCT 4126 e 4127, num nível aproximado de 80% de similaridade (Figura 26). Os três primeiros fungos possuem afinidades morfológicas, apresentando características tipo *Mucor*, como, por exemplo, a presença de columela e esporângios com muitos esporos (Figuras 4,7,3, respectivamente). Por outro lado, os últimos, ou seja, as duas linhagens de *Mycotypha microspora* CCT 4126 e 4127 (Figura 9) que também foram reunidas neste mesmo *cluster*, morfológicamente são mais próximas à *Benjaminiella youngii* (Figura 8). Ambas as espécies apresentam o estado leveduriforme, além do filamentoso, sendo esta uma das características que as reúnem numa mesma família.

Mycotypha microspora CCT 4126 e 4127 e *Benjaminiella youngii* CCT 4121 apresentaram um nível aproximado de 37% de similaridade, sendo que *Benjaminiella youngii* CCT 4121 ficou na posição mais distante no dendrograma, exceto por *Volutella* sp CCT 2995, por apresentar um perfil de ácidos graxos muito distinto das outras linhagens da mesma classe, como a presença dos FAMES 3 e 5 (Figura 26, Tabela 10).

Rhizomucor miehei CCT 2236 e *Rhizomucor pusillus* CCT 4133 foram agrupadas em um *cluster* em nível aproximado de 93% de similaridade, uma vez que estes isolados apresentaram diferença com relação a um único ácido graxo, o 18:0 presente apenas em *Rhizomucor miehei* CCT 2236 (Figura 26, Tabela 10). Este agrupamento corrobora a pequena distinção morfológica apresentada pelos representantes destas espécies, justificando o fato de pertencencermos ao mesmo gênero (Figuras 5,6).

Tabela 10. Perfil qualitativo de ácidos graxos dos fungos estudados.

Ácidos graxos	12:0	14:0	FAME 1	16:0	16:1	FAME 2	FAME 3	FAME 4	18:0	18:1	FAME 5	18:2	FAME 6	18:3	FAME 7	FAME 8	FAME 9	20:2	22:0	FAME 10
M.cir ¹		X		X	X			X		X	X	X		X	X		X	X		X
B.Jam ²	X	X	X	X	X	X		X	X	X		X		X	X		X	X	X	X
C.sim ³	X	X		X	X	X		X	X	X		X	X	X	X		X	X		X
R.mie ⁴			X	X	X	X		X		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
R.pus ⁵			X	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
M.ram ⁶		X		X	X	X		X	X	X		X	X	X	X		X	X		X
B.you ⁷	X	X		X			X			X	X	X		X			X			
M.mi A ⁸	X	X	X	X	X	X		X		X		X	X	X	X		X	X		X
M.mi B ⁹	X	X	X	X	X	X		X		X		X	X	X	X		X	X		X
C.bl A ₁ ¹⁰			X	X		X		X		X		X	X	X	X		X	X		X
C.bl A ₂ ¹¹			X	X		X		X		X		X	X	X	X		X	X		X
Volu ¹²				X					X	X		X			X					

¹ *Mucor circinelloides* f. *janssenii*; ² *Backusella lamprospora*; ³ *Circinella simplex*; ⁴ *Rhizomucor miehei*; ⁵ *Rhizomucor pusillus*; ⁶ *Mortierella ramanniana*; ⁷ *Benjaminiella youngii*; ⁸ *Mycotypha microspora* A; ⁹ *Mycotypha microspora* B; ¹⁰ *Cunninghamella blakesleeana* A₁; ¹¹ *Cunninghamella blakesleeana* A₂; ¹² *Volutella* sp.

Tabela 11. Proporções relativas médias (%) dos ácidos graxos dos fungos estudados.

Ácidos graxos	12:0	14:0	FAME 1	16:0	16:1	FAME 2	FAME 3	FAME 4	18:0	18:1	FAME 5	18:2	FAME 6	18:3	FAME 7	FAME 8	FAME 9	20:2	22:0	FAME 10
M.cir ¹		4,2		12	11,1			2	18,3	10	6,1		20,8	2		6,2	4,5		2,6	
B.lam ²	3,6	4,05	1,7	17,65	1,4	2,5		3,7	2,4	14,65		11,3		18,75	2,6		4,6	3,7	3,85	3,4
C.sim ³	3,6	4		21	1,7	2,4		3,2	8,2	18,2		6,8	4,9	5,7	2,2		6,1	6,7		5,2
R.mie ⁴			3,45	5,7	1,45	4,35		5,65		7,15		7,55	8,1	5,8	4,1	7,3	10	8,1	13,75	7,2
R.pus ⁵			1,6	14,75	1,55	2,25		2,9	2,6	14,15		14,3	5,85	3,25	3	7,75	4,75	4,55	12,2	4,3
M.ram ⁶		3,55		24,6	1,15	1,8		2,2	2,15	33,15		6,85	3,25	7,45	2,55		5,25	3,2		2,7
B.you ⁷	2	4,3		4,7			2,7			28,7	4,2	19,8		30,5					2,9	
M.mi A ⁸	2,05	4,2	1,9	18,25	3,6	2,85		3,55		17,3		17,5	5,05	5,45	2,15		6,05	5,45		4,55
M.mi B ⁹	5,7	4,2	3,3	10,1	4,2	4,7		6		8,7		9	8,6	6,6	4,4		9,5	8		6,9
C.bl A ₁ ¹⁰			3,1	10,3		4,4		5,9		8		9,8	9,2	11,7	2,8		14,8	10,6		9,3
C.bl A ₂ ¹¹			2,8	12,5		4,05		4,9		10,7		15,2	7,6	15,15	4		9,05	7,15		6,85
Volu ¹²				28,3					8,3	41,9		18,5			3					

¹ *Mucor circenelloides* f. *janssenii*; ² *Backusella lamprospora*; ³ *Circinella simplex*; ⁴ *Rhizomucor miehei*; ⁵ *Rhizomucor pusillus*; ⁶ *Mortierella ramanniana*; ⁷ *Benjaminiella youngii*; ⁸ *Mycotypha microspora* A; ⁹ *Mycotypha microspora* B; ¹⁰ *Cunninghamella blakesleeana* A₁; ¹¹ *Cunninghamella blakesleeana* A₂; ¹² *Volutella* sp.

Circinella simplex CCT 4260 e *Mortierella ramanniana* CCT 4428 apresentaram perfis de ácidos graxos que se distinguem somente pela presença do ácido graxo 12:0 no perfil da primeira linhagem, e foram portanto agrupadas num *cluster* em nível aproximado de 93% similaridade, da mesma maneira que o foram as linhagens *Rhizomucor miehei* CCT 2236 e *Rhizomucor pusillus* CCT 4133, embora sejam de gêneros e de famílias distintas (Figura 26, Tabela 10).

O perfil de ácidos graxos de *Mycotypha microspora* CCT 4126 e 4127 foi o mesmo (Tabela 10). Esta similaridade pode ser verificada pelo *cluster* em nível de 100% de similaridade em que as linhagens foram agrupadas, constatando-se que são do mesmo gênero e da mesma espécie. Isto também foi verificado para as linhagens *Cunninghamella blakesleeana* CCT 4123 A₁ e A₂, as quais também foram agrupados num *cluster* em nível de 100% de similaridade (Figura 26).

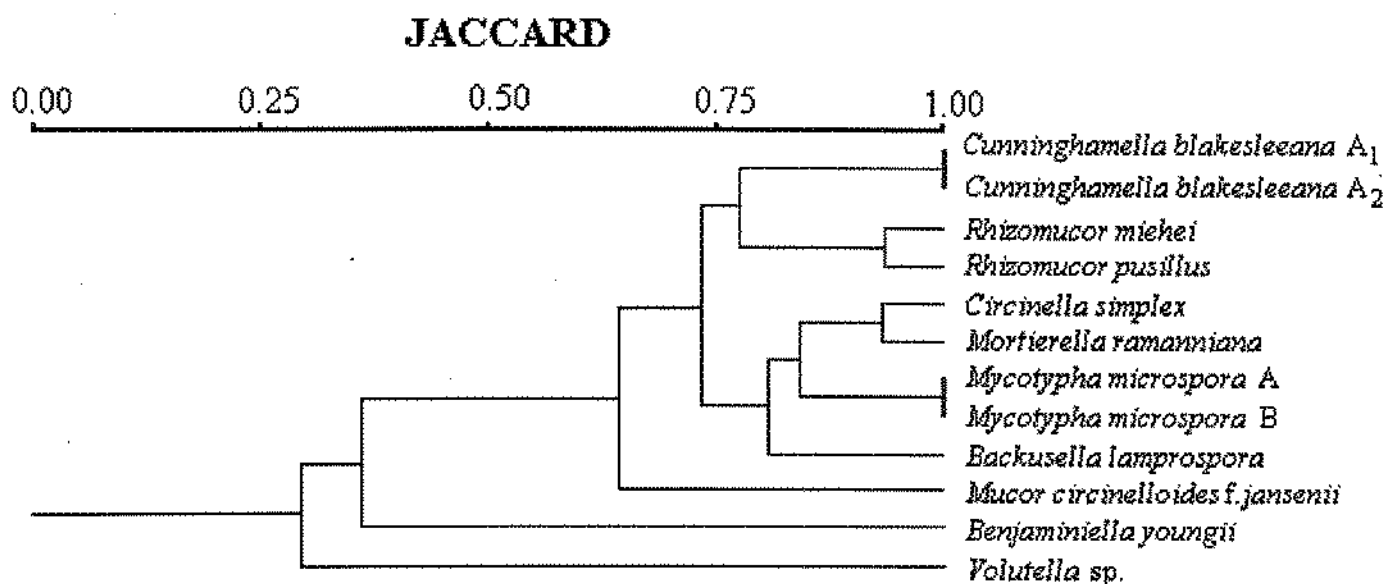


Figura 26. Dendrograma representando as relações entre os fungos analisados baseado na análise numérica (S_j/UPGMA) dos perfis de ácidos graxos.

Volutella sp CCT 2996 ficou posicionada na extremidade do dendrograma, distante das demais linhagens analisadas, o que é reflexo da baixa diversidade de seus ácidos graxos e é coerente com sua posição taxonômica definida por critérios morfológicos (Figura 26, Tabela 10).

De acordo com AMANO *et alii* (1992) os ácidos graxos podem fornecer informação valiosa para estabelecer um sistema taxonômico mais preciso para os fungos. Entretanto, os perfis de ácidos graxos, como qualquer outro caractere taxonômico, não devem ser considerados isoladamente,

mas em conjunto com outros dados disponíveis, como, por exemplo os critérios morfológicos (TYRRELL, 1969, 1971; FARAG *et alii*, 1981; LECHEVALIER & LECHEVALIER, 1988), possibilitando a complementação de informações em caso de dúvidas.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o perfil qualitativo de ácidos graxos possa ser um caractere quimiotaxonômico importante para a classificação de fungos da ordem Mucorales (Zigomicetos). Entretanto, como qualquer outro caractere taxonômico, o perfil de ácidos graxos não deveria ser considerado isoladamente, mas em conjunto com outros dados disponíveis, como, por exemplo critérios morfológicos.

A eficiência do perfil de ácidos graxos como ferramenta quimiotaxonômica foi demonstrada uma vez que duas espécies de um mesmo gênero foram diferenciadas por um único ácido graxo (*Rhizomucor miehei* CCT 2236 e *Rhizomucor pusillus* CCT 4133), enquanto que duas linhagens de uma mesma espécie (*Mycotypha microspora* CCT 4126 e 4127) e duas culturas de uma mesma linhagem (*Cunninghamella blakesleeana* CCT 4123 A₁ e A₂) exibiram o mesmo perfil de ácidos graxos. Isto sugere que a técnica poderia ser adequada para discriminação de fungos em nível específico.

A identificação de algumas destas espécies pode ser realizada através de marcadores quimiotaxonômicos. O ácido graxo não identificado FAME8 pode ser um marcador para o gênero *Rhizomucor* e o ácido graxo não identificado FAME3 para *Benjaminiella youngii*. O ácido graxo 18:3ω6 foi confirmado como marcador quimiotaxonômico para as linhagens pertencentes à ordem Mucorales estudadas no presente trabalho.

As proporções relativas dos ácidos graxos extraídos apresentaram grandes diferenças em algumas das repetições realizadas, possivelmente pelas biomassas não terem sido coletadas com um peso padrão. Portanto, a análise semi-quantitativa dos ácidos graxos não forneceu informações quimiotaxonômicas adequadas para a caracterização dos fungos analisados.

Maiores estudos deveriam ser realizados com os fungos *Circinella simplex* CCT 4260 e *Mortierella ramanniana* CCT 4428, membros de famílias distintas, que foram agrupados num mesmo nível de similaridade em que foram *Rhizomucor miehei* CCT 2236 e *Rhizomucor pusillus* CCT 4133; e com o fungo *Benjaminiella youngii* CCT 4121 que ficou numa posição mais distante em relação aos outros membros da classe Zigomicetos e apresentou 37% de similaridade em relação às linhagens *Mycotypha microspora* CCT 4126 e 4127. Ambas as espécies apresentam características em comum que as reúnem numa mesma família. Para uma classificação natural de

Zigomicetos, características morfológicas podem não ser suficientes, podendo ser complementada com características bioquímicas, tais como o perfil de ácidos graxos.

Os FAMES ainda não identificados, principalmente aqueles que resultaram em marcadores quimiotaxonômicos para algumas das espécies estudadas, deverão ser identificados com o auxílio de cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Estes marcadores poderão ainda ser testados quanto a viabilidade da sua aplicação para um maior número de linhagens.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AMANO, N.; SHINMEN, Y.; AKIMOTO, K.; KAWASHIMA, H.; AMACHI, T.; SHIMIZU, S. & YAMADA, H. (1992). Chemotaxonomic significance of fatty acid composition in the genus *Mortierella* (Zygomycetes, Mortierellaceae). *Mycotaxon* **44**: 257-265.
- BAJPAI, P.; BAJPAI, P.K; & WARD, O.P. (1991). Effects of aging *Mortierella* mycelium on production of arachidonic and eicosapentaenoic acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **68**(10): 775-780.
- BENJAMIN, R.K. (1959). The merosporangiferous Mucorales. *Aliso* **4**(2): 321-433.
- BENNY, G.L. & BENJAMIN, R.K. (1975). Observations on Thamniaceae (Mucorales). New taxa, new combinations and notes on selected species. *Aliso* **8**(3): 301-351.
- BENNY, G.L. & BENJAMIN, R.K. (1976). Observations on Thamniaceae (Mucorales). II. *Chaetocladium*, *Cokeromyces*, *Mycotypha* and *Phascolomyces*. *Aliso* **8**(3): 301-351.
- BENNY, G.L.; KIRK, P.M. & SAMSON, R.A. (1985). Observations on Thamniaceae (Mucorales). III. Mycotyphaceae fam. nov. and a re-evaluation of *Mycotypha* sensu Benny and Benjamin illustrated by two new species. *Mycotaxon* **22**(1): 119-148.
- BEYNEN, A.C. & KATAN, M.B. (1989). Impact of dietary cholesterol and fatty acids on serum lipids and lipoproteins in man. In *The Role of Fats in Human Nutrition* (ed. A.J. Vergroesen & M. Crawford) pp. 237-286, 2nd Ed. London; Academic Press.
- BLOMQUIST, G.; ANDERSSON, B.; ANDERSSON, K. & BRONDZ, I. (1992). Analyses of fatty acids. A new method for characterization of moulds. *Journal of Microbiological Methods* **16**(1): 59-68.
- BOBBIO, F.O. & BOBBIO, P.A. (1992). *Introdução à Química de Alimentos*. 223 pp. 2ª Ed. São Paulo: Livraria Varela.

- BÖTTGER, E.C.** (1996). Approaches for identification of microorganisms. Despite longer experience with fatty acid profiles, DNA-based analysis offers several advantages. *American Society for Microbiology News* **62**(5): 247-250.
- BRENNAN, P.J. & LÖSEL, D.M.** (1978). Physiology of fungal lipids: selected topics. *Advances in Microbiology and Physiology* **17**: 47-179.
- BRONDZ, I. & OLSEN, I.** (1986). Review. Chemotaxonomy of selected species of the *Actinobacillus-Haemophilus-Pasteurella* group by means of gas chromatography, gas chromatography-mass spectrometry and bioenzymatic methods. *Journal of Chromatography* **380**: 1-17.
- CHRISTIE, W.W.** (1982). *Lipid Analysis. Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*. 207 pp., 2nd Ed. Oxford: Pergamon Press.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. & BONATO, P.S.** (1993). *Introdução a Métodos Cromatográficos*. 279 pp., 5th Ed. Campinas: Editora da UNICAMP.
- COONEY, J.J.; DOOLITTLE, M.M.; GRAHL-NIELSEN, O.; HAALAND, I.M. & KIRK Jr, P.W.** (1993). Comparison of fatty acids of marine fungi using multivariate statistical analysis. *Journal of Industrial Microbiology* **12**: 373-378.
- DEXTER, Y. & COOKE, R.C.** (1984). Fatty acids, sterols and carotenoids of the psychrophile *Mucor strictus* and some mesophilic species. *Transactions of the British Mycological Society* **83**: 455-461.
- DOMSCH, K.H.; GAMS, W. & ANDERSON, T.-H.** (1980). *Compendium of Soil Fungi* vol **1**, 859 pp., Eching: IHW-Verlag. Reprint 1993.
- EMBLEY, T.M. & WAIT, R.** (1994). Structural lipids of Eubacteria. In *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics* (ed. M. Goodfellow & A.G. O'Donnell), pp. 121-161, Chichester: John Wiley and Sons Ltd.

- FARAG, R.S.; YOUSSEF, A.M.; KHALIL, F.A. & TAHA, R.A.** (1981). The lipids of various fungi grown on an artificial medium. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **58**: 765-768.
- GRAHAM, J.H.; HODGE, N.C. & MORTON, J.B.** (1995). Fatty acid methyl ester profiles for characterization of Glomalean fungi and their Endomycorrhizae. *Applied and Environmental Microbiology* **61**(1): 58-64.
- GRAVESEN, S.; FRISVAD, J. & SAMSON, R.A.** (1994). *Microfungi*. 168 pp., Copenhagen: Munksgaard.
- GUERRERO, R.T. & SILVEIRA, R.M.B.** (1996). *Glossário Ilustrado de Fungos*. 93 pp., Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS.
- HAMMONDS, P. & SMITH, S.N.** (1986). Lipid composition of a psychrophilic, a mesophilic and a thermophilic *Mucor* species. *Transactions of the British Mycological Society* **86**: 551-560.
- HANSSON, L. & DOSTÁLEK, M.** (1988). Effect of culture conditions on mycelial growth and production of gamma-linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **28**: 240-246.
- HARWOOD, J.L. & RUSSELL, N.J.** (1984). *Lipids in Plants and Microbes*. 162 pp., London: George Allen & Unwin.
- HAWKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C. & PEGLER., D.N.** (1995). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 616 pp., 8th Ed. Wallingford: CAB International.
- HESELTINE, C.W. & FENNELL, D.I.** (1955). The Genus *Circinella*. *Mycologia* **47**: 193-212.
- IUPAC-IUB COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURE.** (1978). The nomenclature of lipids. *Biochemical Journal* **171**(1): 21-35.

- JABAJI-HARE, S.** (1988). Lipid and fatty acid profiles of some vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: contribution to taxonomy. *Mycologia* **80**: 622-629.
- JOHNK, J.S. & JONES, R.K.** (1992). Determination of whole-cell fatty acids in isolates of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. *Phytopathology* **82**(1): 68-72.
- JOHNK, J.S. & JONES, R.K.** (1994). Comparison of whole-cell fatty acid compositions in intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* AG-1. *Phytopathology* **84**(3): 271-275.
- JOHNK, J.S.; JONES, R.K.; SHEW, H.D. & CARLING, D.E.** (1993). Characterization of populations of *Rhizoctonia solani* AG-3 from potato and tobacco. *Phytopathology* **83**(8):854-858.
- KENDRICK, A. & RATLEDGE, C.** (1992a). Phospholipid fatty acid distribution of three fungi indicates positional specificity for n-6 vs. n-3 fatty acids. *Lipids* **27**(7): 505-508.
- KENDRICK, A. & RATLEDGE, C.** (1992b). Desaturation of polyunsaturated fatty acids in *Mucor circinelloides* and the involvement of a novel membrane-bound malic enzyme. *European Journal of Biochemistry* **209**(2): 667-673.
- KIRK, P.M.** (1989). A new species of *Benjaminiella* (Mucorales: Mycotyphaceae). *Mycotaxon* **35**(1): 121-125.
- KORN, E.D.; GREENBLATT, C.L. & LEES, A.M.** (1965). Synthesis of unsaturated fatty acids in the slime mold *Physarum polycephalum* and the zooflagellates *Leishmania tarentolae*, *Trypanosoma lewisi*, and *Crithidia* sp.: a comparative study. *Journal of Lipid Research*. **6**(1): 43-50.
- LECHEVALIER, H & LECHEVALIER, M.P.** (1988). Chemotaxonomic use of lipids - an overview. In *Microbial Lipids vol 1* (ed. C. Ratledge & S.G. Wilkinson), pp. 869-902. New York: Academic Press.
- LEHNINGER, A.L.** (1988). *Princípios de Bioquímica*. 725 pp., São Paulo: Sarvier.
- LÖSEL, D.M.** (1988). Fungal lipids. In *Microbial Lipids vol 1* (ed. C. Ratledge & S.G. Wilkinson), pp. 699-806. New York: Academic Press.

- MARTÍNEZ, A.T.; BARRASA, J.M.; PRIETO, A. & BLANCO, M.N.** (1991). Fatty acid composition and taxonomic status of *Ganoderma australe* from Southern Chile. *Mycological Research* **95**(7): 782-784.
- MÜLLER, M.M.; KANTOLA, R. & KITUNEN, V.** (1994). Combining sterol and fatty acid profiles for the characterization of fungi. *Mycological Research* **98**(6): 593-603.
- MUMMA, R.O.; SEKURA, R.D. & FERGUS, C.L.** (1971). Thermophilic fungi: II. Fatty acid composition of polar and neutral lipids of thermophilic and mesophilic fungi. *Lipids* **6**(8): 584-588.
- RATLEDGE, C.** (1982). Microbial oils and fats: an assessment of their commercial potential. In *Progress in Industrial Microbiology* (ed. M.J. Bull), pp. 119-206.
- RATLEDGE, C. & WILKINSON, S.G.** (1988a). An overview of microbial lipids. In *Microbial Lipids vol 1* (ed. C. Ratledge & S.G. Wilkinson), pp. 3-22. New York: Academic Press.
- RATLEDGE, C. & WILKINSON, S.G.** (1988b). Fatty acids, related and derived lipids. In *Microbial Lipids vol 1* (ed. C. Ratledge & S.G. Wilkinson), pp. 23-53. New York: Academic Press.
- ROHLF, J.F.** (1988). NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 1.40. Exeter Publishing. LTD.
- RUITER, G.A. de; VAN BRUGGEN-VAN DER LUGT, A.W.; ROMBOUITS, F.M. & GAMS, W.** (1993). Approaches to the classification of the *Mortierella isabellina* group: antigenic extracellular polysaccharides. *Mycological Research* **97**(6): 690-696.
- SAMSON, R.A.** (1969). Revision of the genus *Cunninghamellaceae* (Mucorales). *Mycology* **72**: 322-335.
- SANCHOLLE, M. & DALPÉ, Y.** (1993). Taxonomic relevance of fatty acids of arbuscular mycorrhizal fungi and related species. *Mycotaxon* **49**: 187-193.

- SASSER, M.** (1990). Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Technical note 101. Microbial ID Inc., Newark, Del.
- SCHIPPER, M.A.A.** (1976). On *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus* and related species. *Studies in Mycology* **12**: 1-40.
- SCHIPPER, M.A.A.** (1978). 1. On certain species of *Mucor* with a key to all accepted species. 2. On the genera *Rhizomucor* and *Parasitella*. *Studies in Mycology* **17**: 1-71.
- SHAW, R.** (1965). The occurrence of γ -linolenic acid in fungi. *Biochimica et Biophysica Acta* **98**: 230-237.
- SHAW, R.** (1966a). The fatty acids of phycomycete fungi, and the significance of the γ -linolenic acid component. *Comparative Biochemistry and Physiology* **18**: 325-331.
- SHAW, R.** (1966b). The polyunsaturated fatty acids of microorganisms. *Advances in Lipid Research* **4**: 107-174.
- SHAW, R.** (1967). Fatty acids of fruiting bodies of basidiomycetes. *Nature* **7**: 86-87.
- SHIMIZU, S.; KAWASHIMA, H.; SHINMEN, Y.; AKIMOTO, K., & YAMADA, H.** (1988). Production of eicosapentaenoic acid by *Mortierella* fungi. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **65**(9): 1455-1459.
- SHINMEN, Y., SHIMIZU, S., AKIMOTO, K., KAWASHIMA, H. & YAMADA, H.** (1989). Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi. Selection of a potent producer and optimization of culture conditions for large-scale production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**(1): 11-16
- SUMNER, J.L. & MORGAN, E.D.** (1969). The fatty acid composition of sporangiospores and vegetative mycelium of temperature adapted fungi in the order Mucorales. *Journal of General Microbiology* **59**: 215-221.
- SUZUKI, K; GOODFELLOW, M. & O'DONNELL, A.M.** (1993). Cell envelopes and classification. In *Handbook of New Bacterial Systematics* (ed. M. Goodfellow & A.G. O'Donnell), pp. 195-249. London: Academic Press.

- TORLANOVA, B.O.; KONOVA, I.V.; FUNTIKOVA, N.S.; BABANOVA, N.K.; KATOMINA, A.A. & MYSYAKINA, I.S.** (1992). Influence of the conditions of culturing of a *Mucor* fungus, treatment of biomass, and extraction ability on the production of lipids containing γ -linolenic acid. *Applied Biochemistry and Microbiology* **28**(4): 461-468.
- TRUFEM, S.F.B.** (1981). Mucorales do estado de São Paulo. 1. Gêneros *Circinella* van Tieghem & Le Monnier e *Cunninghamella* Matruchot. *Rickia* **9**: 113-120.
- TYRRELL, D.** (1967). The fatty acid compositions of 17 Entomophthoraceae isolates. *Canadian Journal of Microbiology* **13**: 755-760.
- TYRRELL, D.** (1968). The fatty acid composition of some Entomophthoraceae. II. The occurrence of branched-chain fatty acids in *Conidiobolus denaeosporus* Drechsl. *Lipids* **3**(4): 368-372.
- TYRRELL, D.** (1969). Biochemical systematics and fungi. *The Botanical Review* **35**: 305-316.
- TYRRELL, D.** (1971). The fatty acid composition of some Entomophthoraceae. III. *Canadian Journal of Microbiology* **17**: 1115-1118.
- WASSEF, M.K.** (1977). Fungal lipids. *Advances in Lipid Research* **15**:159-232.
- WESTHUIZEN, J.P.J. van der; KOCK, J.L.F.; BOTHA, A. & BOTES, P.J.** (1994). The distribution of the ω 3- and ω 6-series of cellular long-chain fatty acids in fungi. *Systematic and Applied Microbiology* **17**: 327-345.

ANEXO

Tabela A1. Proporções relativas (%) dos ácidos graxos dos fungos estudados, obtidas dos cromatogramas das duas ou três repetições, representados pelos números 1, 2 e 3 que correspondem às datas em que foram realizadas (tabela 8).

Ácidos graxos		12:0	14:0	FAME 1	16:0	16:1	FAME 2	FAME 3	FAME 4	18:0	18:1	FAME 5	18:2	FAME 6	18:3	FAME 7	FAME 8	FAME 9	20:2	22:0	FAME 10
M. cir ¹	1		4,2		12,4	9,6			2,1		18,2	9,7	5,8		20,4	1,6		4,6	8,0		3,2
	2		4,2		13,4	10,9			2,5		20,3	11,6	6,0		20,5	1,6		4,1	2,6		2,2
	3		4,1		10,1	12,9			1,3		16,4	8,8	6,6		21,6	2,8		10,0	2,9		2,3
B.lam ²	2	1,6	3,0	2,2	16,5	1,5	3,2		3,9	1,5	14,8		10,6		19,1	3,9		5,9	4,8	2,7	4,6
	3	5,6	5,1	1,2	18,8	1,3	1,8		3,5	3,3	14,5		12,0		18,4	1,3		3,3	2,6	5,0	2,2
C.sim ³	1	4,6	4,5		22,4	1,3	2,0		2,7	8,8	17,9		8,1	4,3	6,2	1,8		5,7	5,2		4,5
	2	4,8	4,5		17,3	2,4	3,8		5,1	5,1	13,2		4,3	7,1	4,7	2,7		8,7	8,4		7,8
	3	1,4	2,9		23,4	1,5	1,4		1,8	10,8	23,5		7,9	3,2	6,2	2,1		3,9	6,6		3,3
R.mie ⁴	2			3,9	4,5	1,2	4,5		6,4		5,2		5,7	9,2	4,4	3,1	6,1	11,4	10,1	14,8	8,9
	3			3,0	6,9	1,7	4,2		4,9		9,1		9,4	7,0	7,2	5,1	8,5	8,6	6,1	12,7	5,5
R.pus ⁵	1			1,8	14,6	1,5	2,3		2,9	2,4	14,1		14,4	7,3	3,8	4,2	7,6	4,8	4,2	9,9	3,9
	2			1,4	14,9	1,6	2,2		2,9	2,8	14,2		14,2	4,4	2,7	1,8	7,9	4,7	4,9	14,5	4,7
M.ram ⁶	1		3,7		21,8	1,2	2,5		3,0	2,0	28,1		6,3	4,5	7,3	3,2		7,5	4,9		3,9
	3		3,4		27,4	1,1	1,1		1,4	2,3	38,2		7,4	2,0	7,6	1,9		3,0	1,5		1,5
B.you ⁷	1	1,7	4,5		4,3			2,3			26,7	4,2	19,5		34,8				2,0		
	2	1,8	4,0		5,5			2,6			33,2	3,9	19,7		24,8				4,4		
	3	2,6	4,5		4,3			3,1			26,2	4,6	20,3		31,9				2,4		
M.mi A ⁸	2	2,2	5,1	1,2	21,8	4,9	1,8		2,1		21,0		21,7	2,8	6,3	1,2		3,0	2,7		2,1
	3	1,9	3,3	2,6	14,7	2,3	3,9		5,0		13,6		13,3	7,3	4,6	3,1		9,1	8,2		7,0
M.mi B ⁹	1	7,8	5,8	1,8	13,1	6,8	2,8		4,6		11,0		11,8	4,8	8,4	1,9		7,9	6,6		4,7
	2	5,2	3,7	3,8	9,5	2,7	5,7		6,5		8,1		8,5	8,8	7,6	5,4		9,9	7,7		6,8
	3	4,1	3,1	4,3	7,8	3,1	5,6		6,9		6,9		6,8	12,1	3,8	5,8		10,8	9,6		9,2
C.bl A ₁ ¹⁰	1			3,3	10,2		4,4		5,6		7,5		10,2	8,6	13,1	1,9		18,2	9,0		7,9
	2			2,9	8,4		4,7		6,7		6,7		7,4	10,3	10,5	2,7		14,7	13,1		11,7
	3			3,1	12,4		4,2		5,4		10,0		11,7	8,7	11,5	3,7		11,4	9,6		8,3
C.bl A ₂ ¹¹	1			1,7	15,1		2,6		3,3		13,4		18,4	6,2	16,8	2,9		8,2	6,5		4,8
	2			3,9	9,9		5,5		6,5		8,0		12,0	9,0	13,5	5,1		9,9	7,8		8,9
Volu ¹²	1				28,7					7,3	41,0		19,8			3,1					
	2				27,9					9,4	44,5		15,7			2,5					
	3				28,4					8,2	40,2		19,9			3,4					

¹ *Mucor circenelloides* f. *janssenii*; ² *Backusella lamprospora*; ³ *Circinella simple*; ⁴ *Rhizomucor miehei*; ⁵ *Rhizomucor pusillus*; ⁶ *Mortierella ramanniana*; ⁷ *Benjaminiella youngii*; ⁸ *Mycotypha microspora* A; ⁹ *Mycotypha microspora* B; ¹⁰ *Cunninghamella blakesleeana* A₁; ¹¹ *Cunninghamella blakesleeana* A₂; ¹² *Volutella* sp.

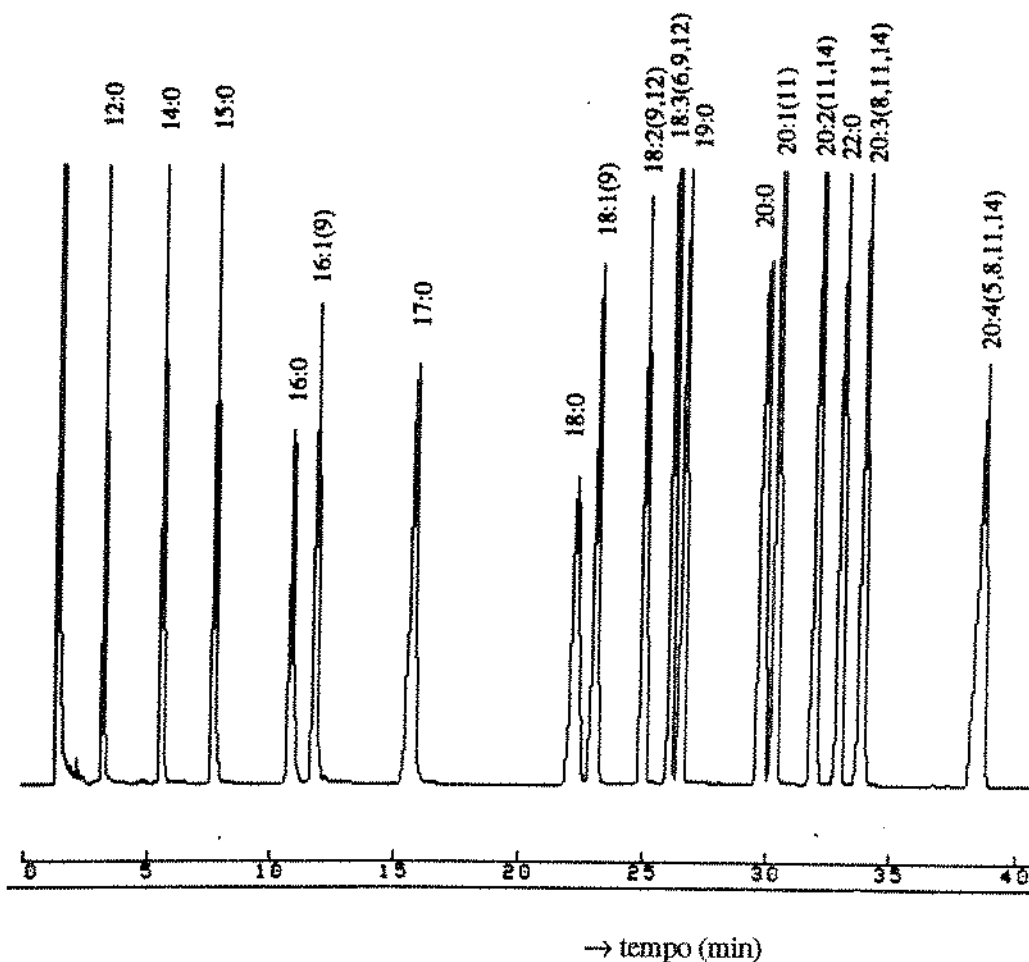


Figura A1. Cromatograma dos ácidos graxos relativos aos FAMES do padrão fornecido pela empresa Matreya, Inc. Lipids and Biochemicals, sob o número de catálogo 4232, analisados em 02/05/96. Coluna: capilar, OmegawaxTM 320, 30 m x 0,32 mm d.i., espessura de filme: 0,25 µm. Condições cromatográficas: velocidade linear: 20 cm³/s, He; Temp. Col. inicial: 160 °C, Tempo inicial: 20 min, Taxa de programação: 5°C/min, Temp. final: 200 °C, Tempo final: 15 min; Temp. Inj.: 250 °C, Temp. Det.: 250 °C; Det.: FID; Razão de Split: 40:1; Vol. Padrão Inj.: 1µL.

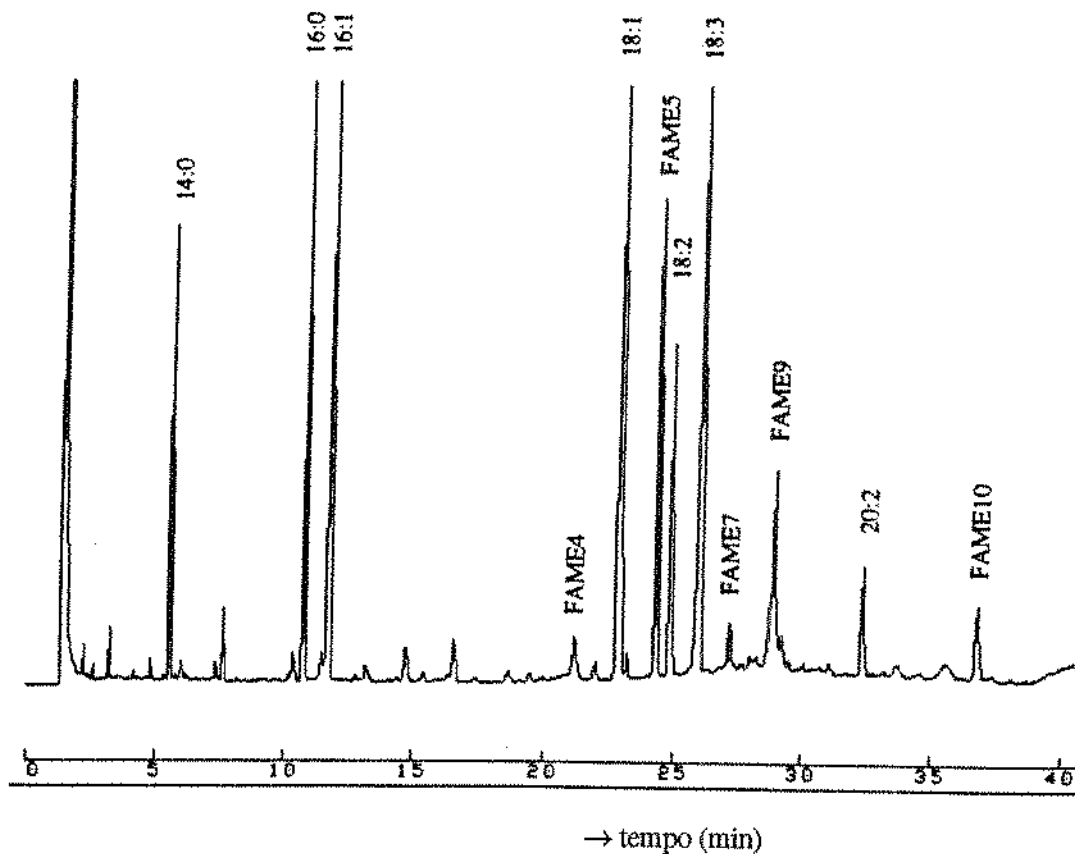


Figura A2. Cromatograma dos ácidos graxos do fungo *Mucor circinelloides* f. *janssenii*, analisados em 02/05/96. Coluna e condições cromatográficas idem à figura A1, exceto o Vol. Amostra Inj.: 2µl.

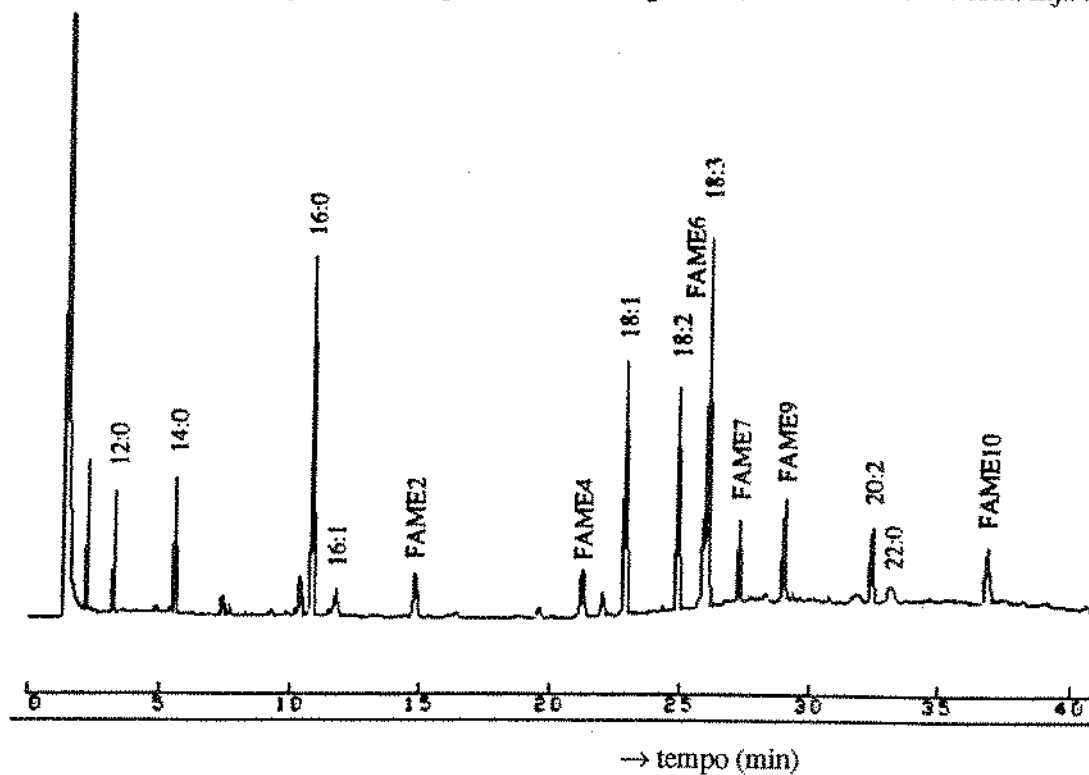


Figura A3. Cromatograma dos ácidos graxos do fungo *Backusella lamprospora*, analisados em 18/04/96. Coluna e condições cromatográficas idem à figura A2.

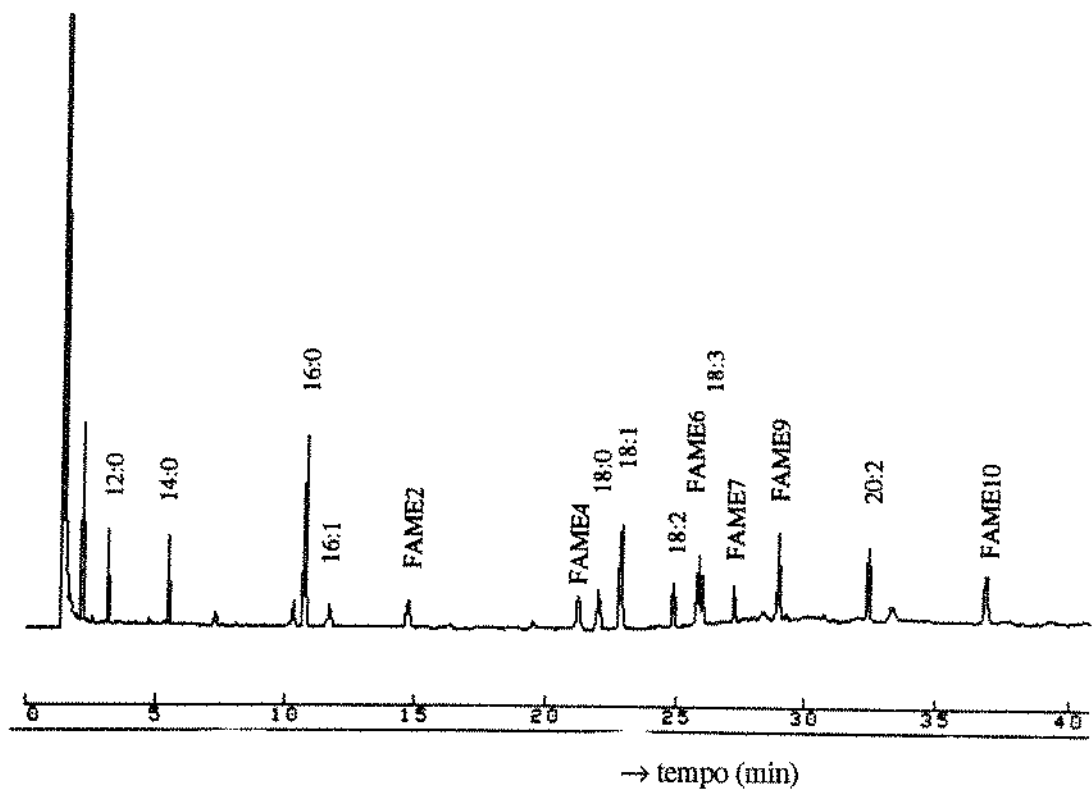


Figura A4. Cromatograma dos ácidos graxos do fungo *Circinella simplex*, analisados em 18/04/96. Coluna e condições cromatográficas idem à figura A2.

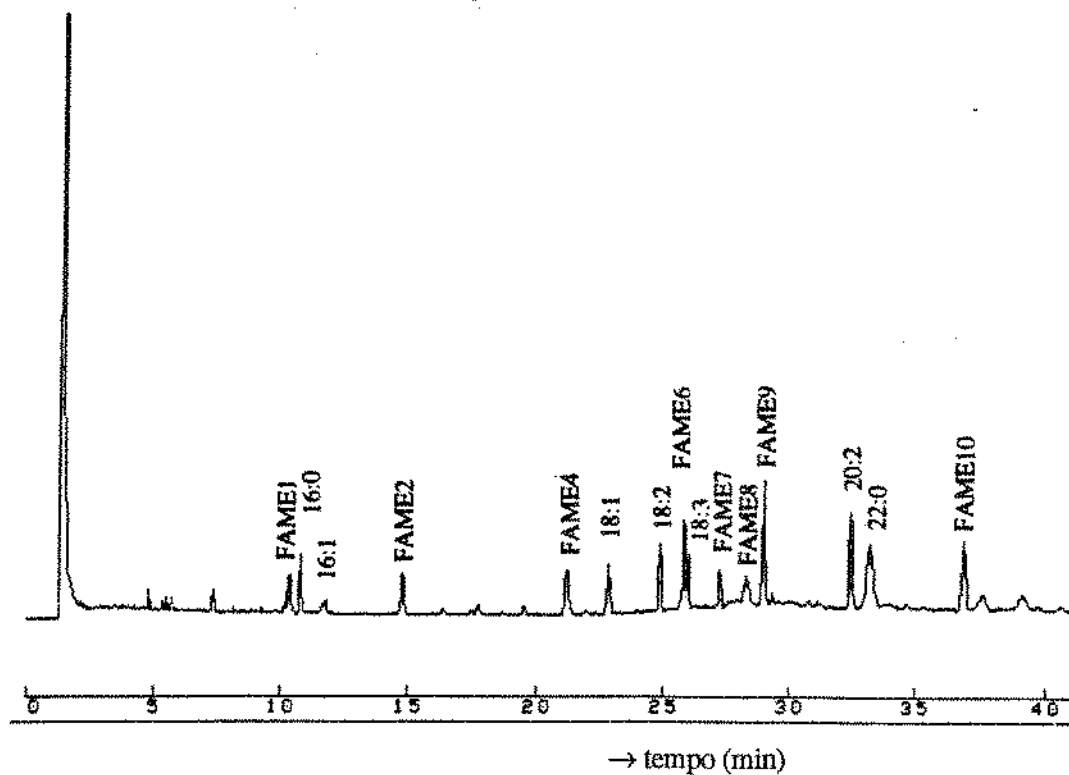


Figura A5. Cromatograma dos ácidos graxos do fungo *Rhizomucor miehei*, analisados em 18/04/96. Coluna e condições cromatográficas idem à figura A2.

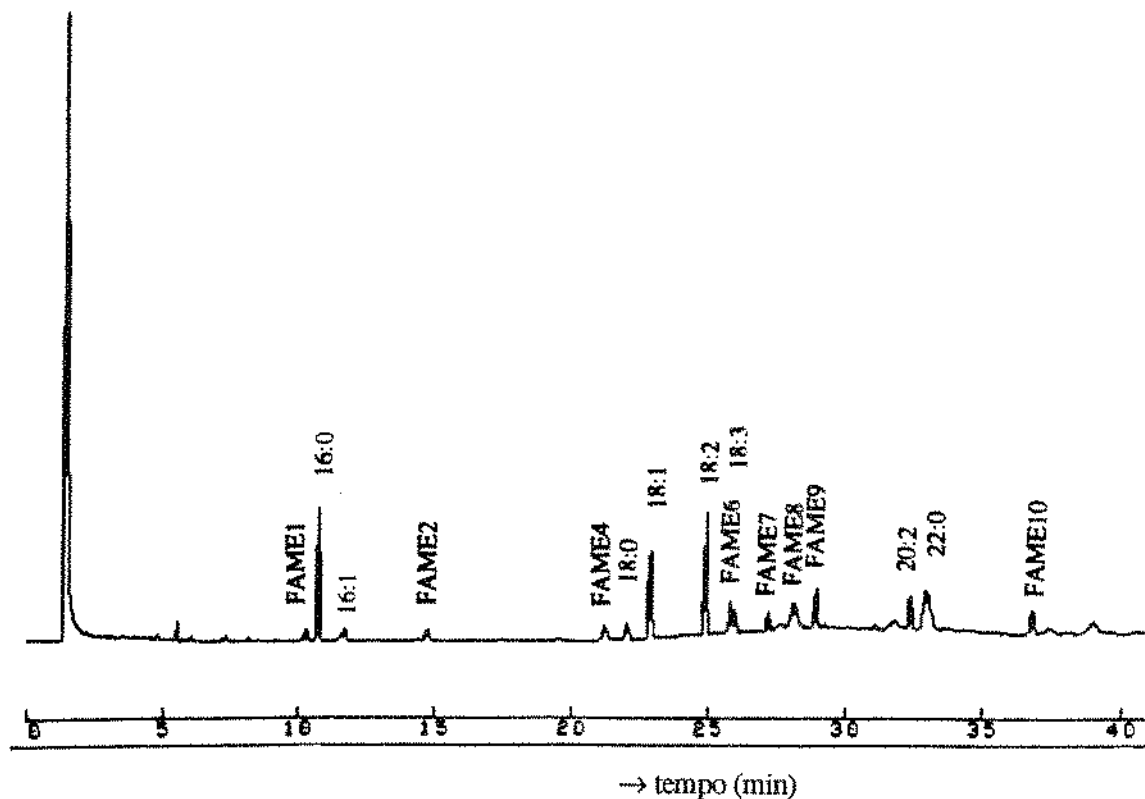


Figura A6. Cromatograma dos ácidos graxos do fungo *Rhizomucor pusillus*, analisados em 18/04/96. Coluna e condições cromatográficas idem à figura A2.

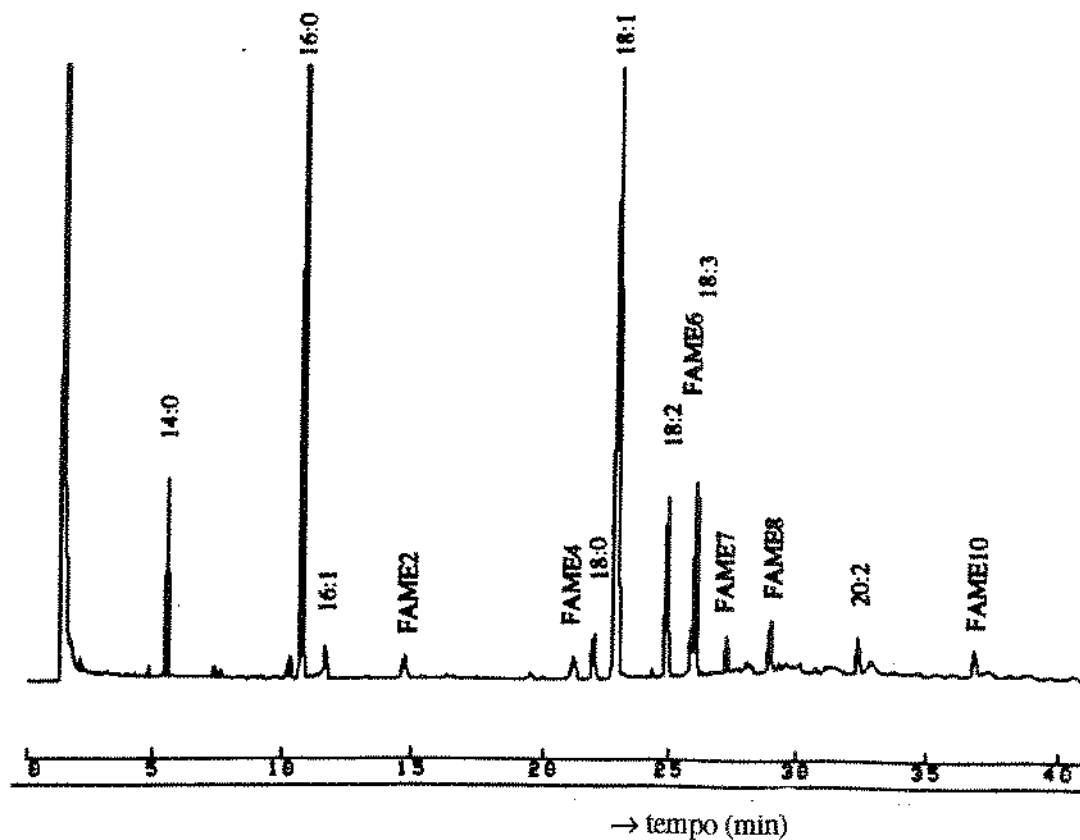


Figura A7. Cromatograma dos ácidos graxos do fungo *Mortierella ramanniana*, analisados em 02/05/96. Coluna e condições cromatográficas idem à figura A2.

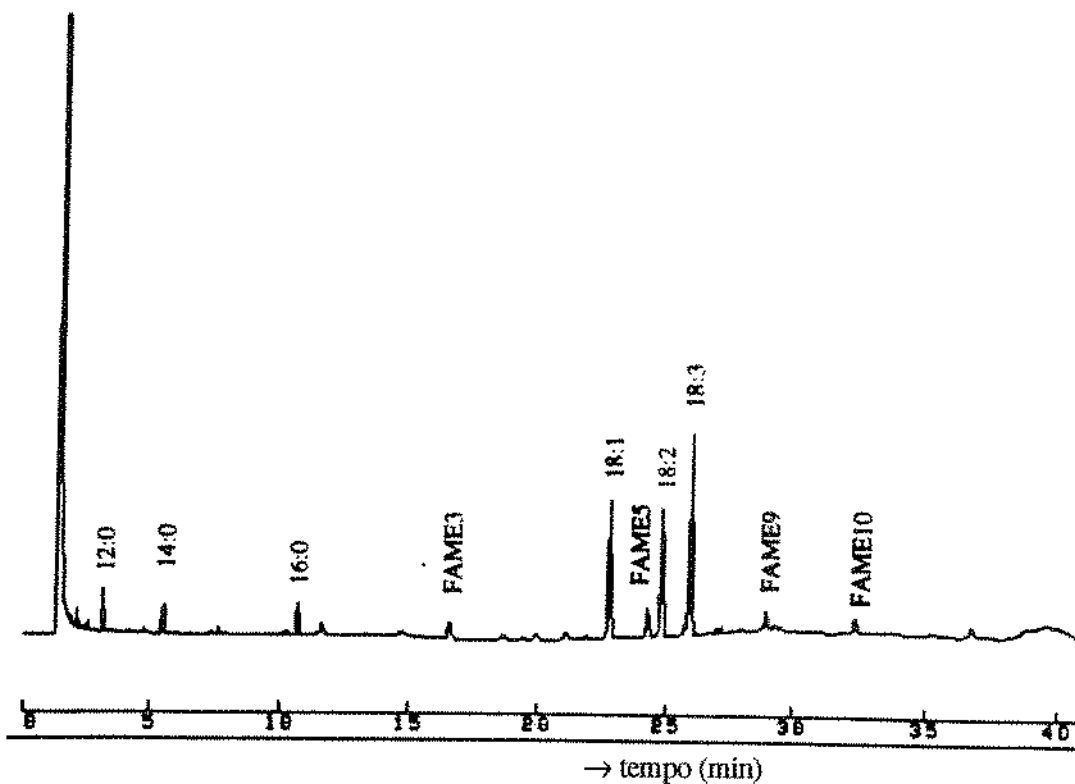


Figura A8. Cromatograma dos ácidos graxos do fungo *Benjaminiella youngii*, analisados em 03/05/96. Coluna e condições cromatográficas idem à figura A2.

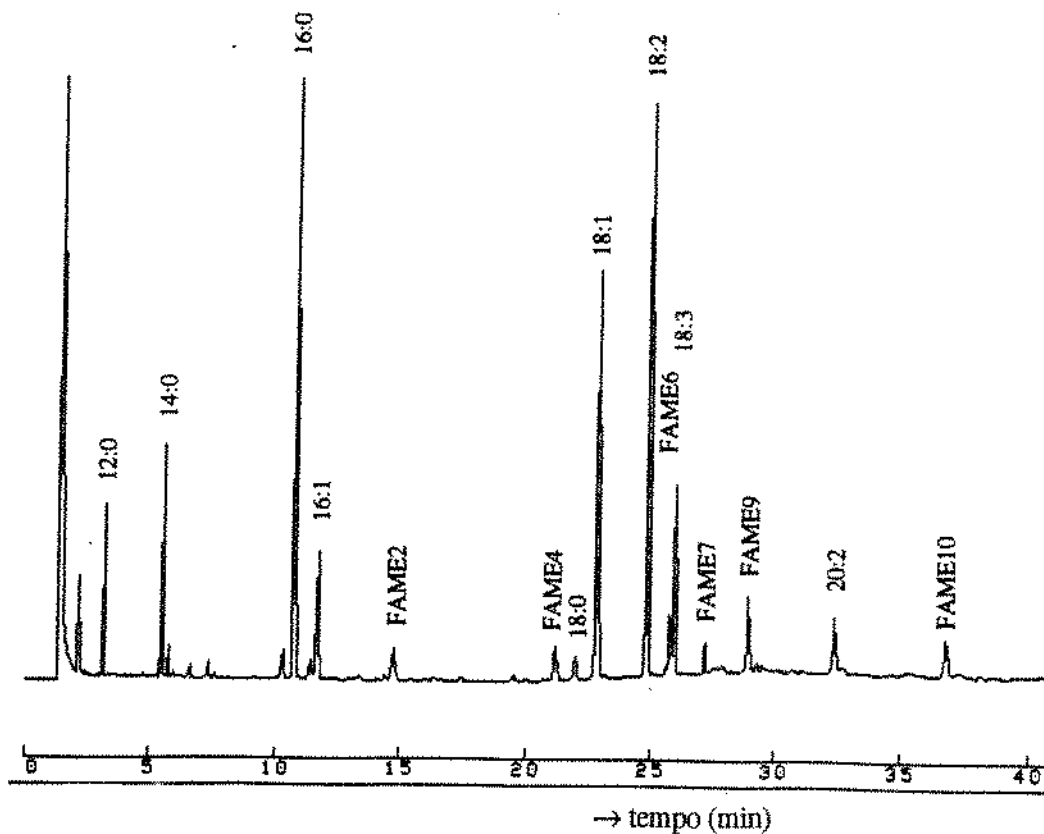


Figura A9. Cromatograma dos ácidos graxos do fungo *Mycotypha microspora A*, analisados em 20/04/96. Coluna e condições cromatográficas idem à figura A2.

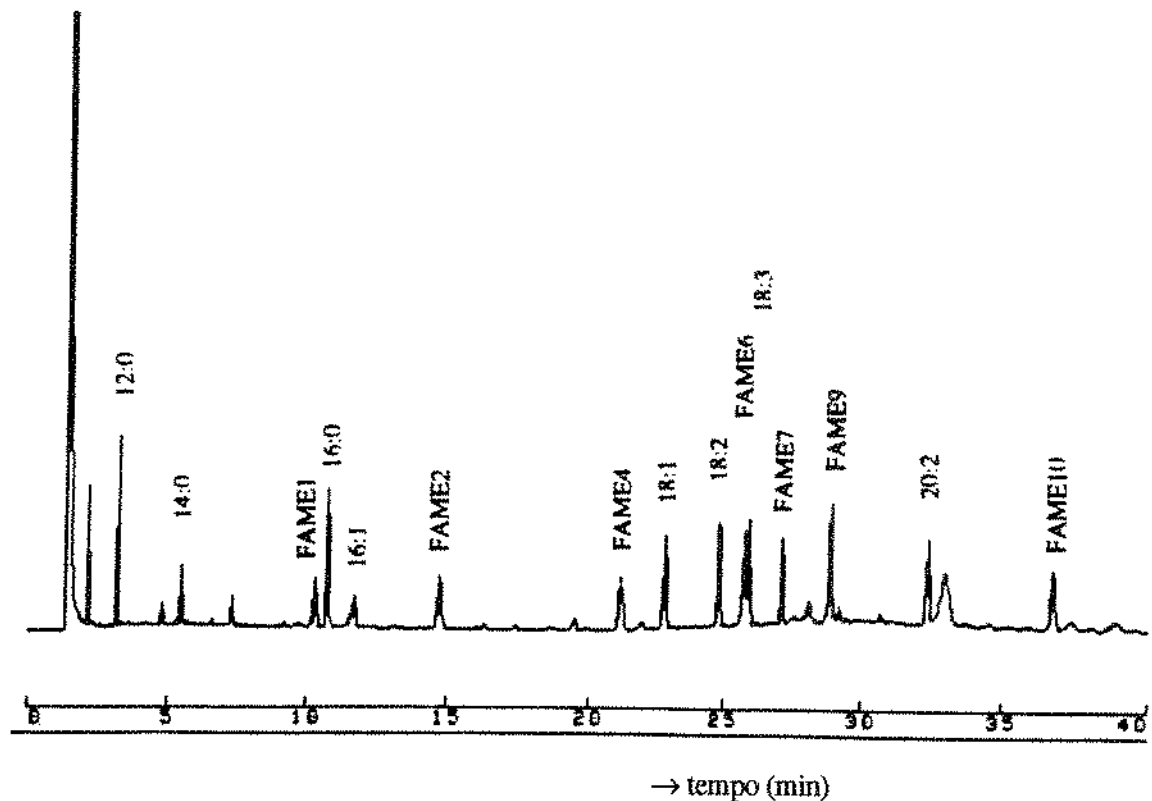


Figura A10. Cromatograma dos ácidos graxos do fungo *Mycotypha microspora* B, analisados em 20/04/96. Coluna e condições cromatográficas idem à figura A2.

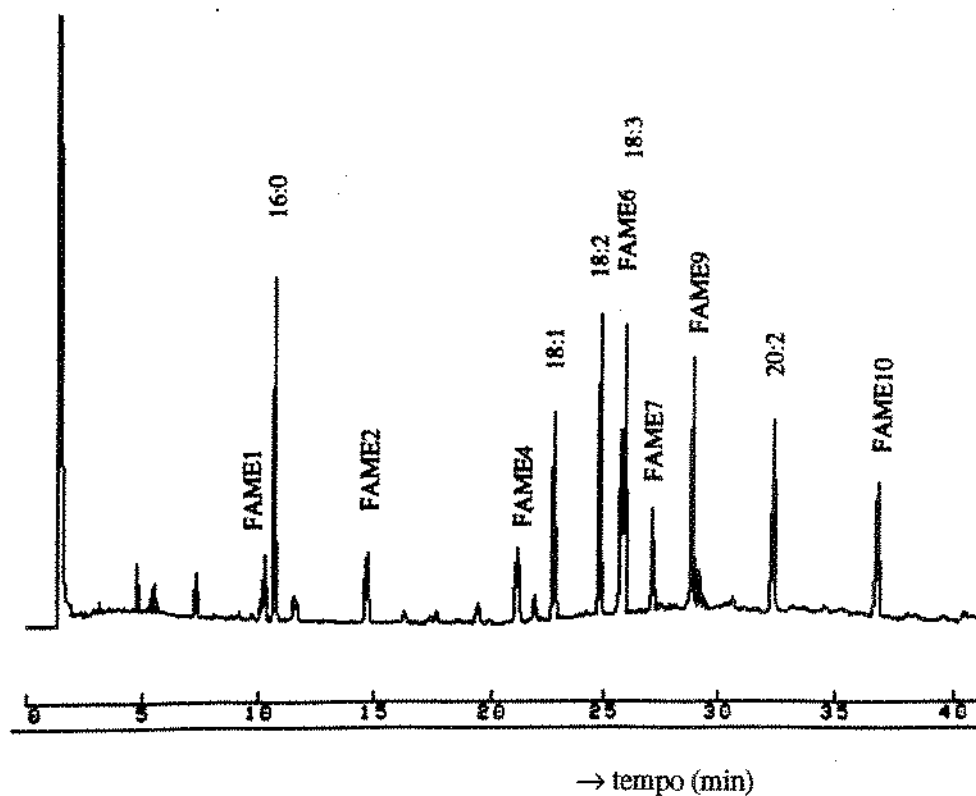


Figura A11. Cromatograma dos ácidos graxos do fungo *Cunninghamella blakesleeana* A₁, analisados em 01/05/96. Coluna e condições cromatográficas idem à figura A2.

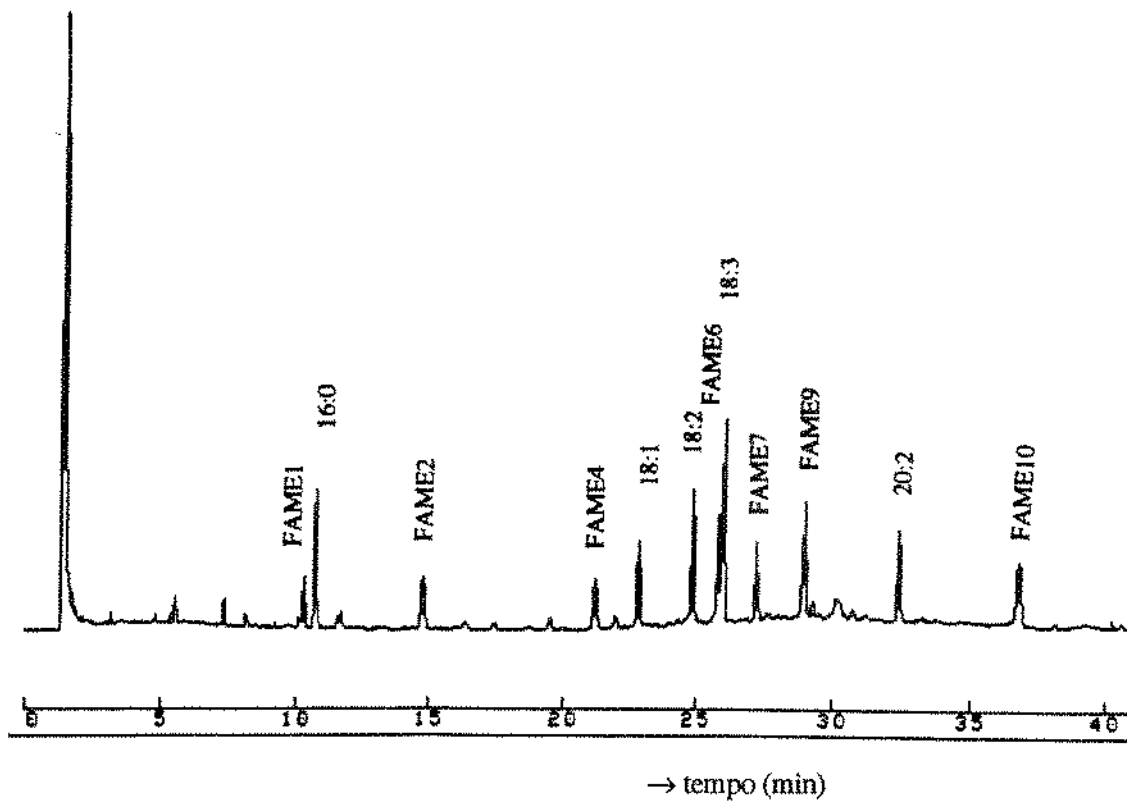


Figura A12. Cromatograma dos ácidos graxos do fungo *Cunninghamella blakesleeana* A₂, analisados em 18/04/96. Coluna e condições cromatográficas idem à figura A2.

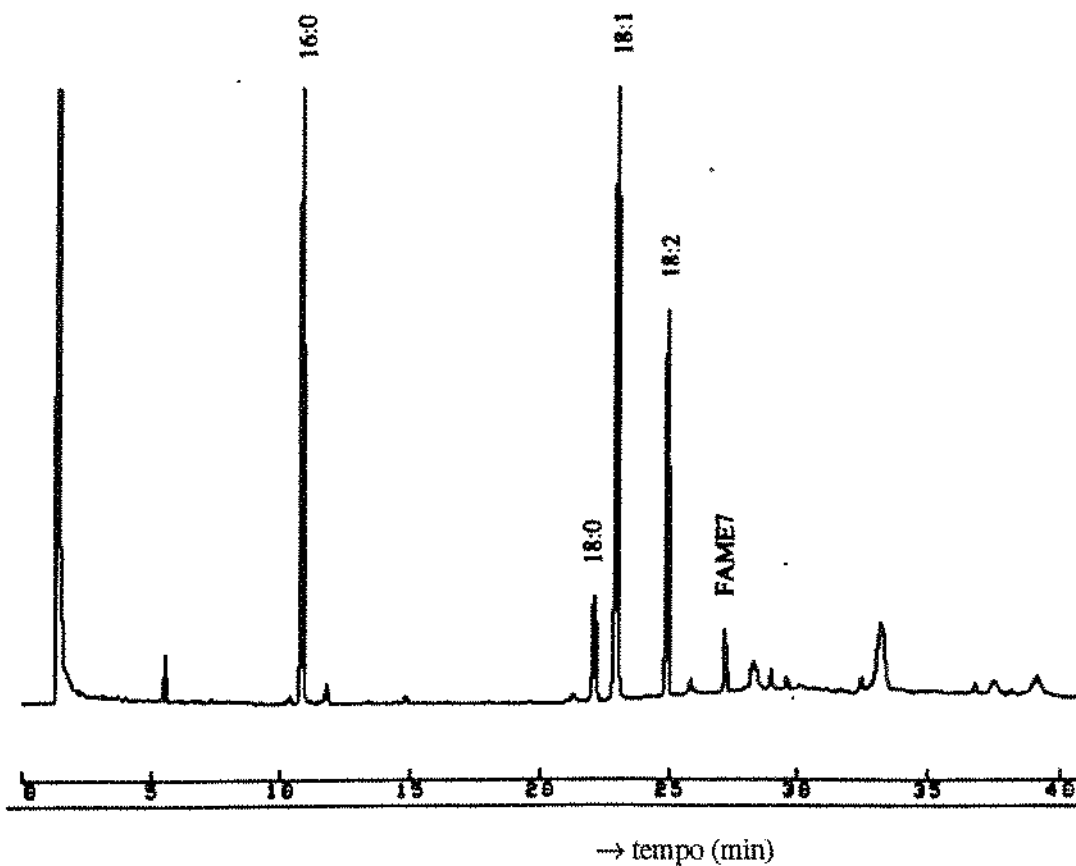


Figura A13. Cromatograma dos ácidos graxos do fungo *Volutella* sp., analisados em 13/04/96. Coluna e condições cromatográficas idem à figura A2.