

Influência do Método de Extracção de Lípidos na Composição em Ácidos Gordos em Fungos Filamentosos

Ana Maria A. Braga da Cruz Ferrão ^a
 Maria de Lourdes Quinta C. Pequeno ^b

Ensaíram-se diversos métodos de extracção de lípidos totais em dois fungos filamentosos «Aspergillus flavus» e «Penicillium oxalicum» crescendo sempre no mesmo meio de cultura.

Determinaram-se por cromatografia gás líquido os ácidos gordos componentes dos lípidos extraídos para escolher qual o método de extracção mais eficiente.

Introdução

Durante muito tempo, a sistemática vegetal socorreu-se essencialmente de caracteres morfológicos. Com o evoluir dos conhecimentos, e muito particularmente nas plantas inferiores, reconheceu-se que a sua diferenciação apenas com base naqueles caracteres, era insuficiente e, recorrendo a outras informações, foi possível separar espécies, variedades e raças que até aí se consideravam como as mesmas.

Uma das tendências que tem sido explorada nesta matéria envolve a procura de diferenças significativas quanto à presença ou quantidade de determinados constituintes. Os resultados conseguidos têm sido, no geral, muito interessantes e uma «quimiotaxonomia» entrou hoje abertamente na linguagem dos cientistas e de muitos utilizadores da ciência, particularmente na área dos microorganismos.

De há muito que um de nós se vem dedicando ao estudo dos ácidos gordos e à diferença específica das plantas superiores através da composição da gordura das sementes em ácidos gordos [3-7] e outro concentrando a sua atenção nos problemas ligados à utilização dos fungos com carácter industrial. Pretende-se agora reunindo as duas áreas de especialização iniciar estudos, em microorganismos, sabendo-se que nestes as características morfológicas são no geral muito idênticas e, por isso, normalmente insuficientes para a sua distinção, tanto mais quanto se sabe que certos tipos de raças, morfológicamente idênticos têm comportamentos tecnológicos e utilizações industriais muito diferentes.

Neste trabalho, que se tem por inovador em Portugal, pretende-se aplicar a dois fungos filamentosos (*Aspergillus flavus* e *Penicillium oxalicum*, cujo interesse é bem conhecido) a técnica de caracterização diferencial com base na composição qualitativa e quantitativa em ácidos gordos dos lípidos dos seus micélios.

Para atingir os objectivos propostos houve que fazer um estudo prévio muito longo para se definirem melhor as técnicas de extracção de lípidos totais e os solventes mais apropriados, trabalhando sempre com fungos que se desen-

volveram no mesmo meio de cultura e em condições idênticas de temperatura e arejamento.

Material

O material é constituído por tecidos miceliais de duas espécies de fungos filamentosos, *Aspergillus flavus* (CCMI 247) e *Penicillium oxalicum* (CCMI 120) obtidos a partir da colecção de culturas existente no Laboratório de Microbiologia Industrial do DCEAI do LNETI.

O material em estudo resultou dos micélios produzidos por 16 culturas do primeiro fungo e 15 culturas do segundo. Os micélios depois de devidamente separados do meio de cultura foram liofilizados e moídos.

QUADRO 1
 ASPERGILLUS FLAVUS

Cultura	Solvente	Lípidos totais (%)
1. ^a	* B. D.	—
2. ^a	* B. D.	4,4
	Acetona + etanol	21,2
	Eter do petróleo	8,8
	Clorofórmio	9,3
3. ^a	Clorofórmio + Metanol (1:1)	—
4. ^a	Acetona + metanol (1:1)	33,1
5. ^a	Eter do petróleo	8,1
	Eter etílico	9,4
	Clorofórmio	10,0
6. ^a	Eter do petróleo	4,5
	Eter etílico	6,1
	Clorofórmio	7,1
7. ^a	Eter do petróleo	6,0
	Eter etílico	8,0
8. ^a	Eter do petróleo	7,0
	Clorofórmio	10,8
9. ^a	* B. D.	4,7
	Eter do petróleo	6,3
	Clorofórmio	9,4

(Continua)

^a Investigadora Principal do LNETI.

^b Investigadora Auxiliar do LNETI.

ASPERGILLUS FLAVUS

Cultura	Solvente	Lípidos totais (%)
10. ^a	* B. D.	3,9
11. ^a	* B.D.	7,0
12. ^a	* B.D. Eter do petróleo	3,0 4,4
13. ^a	* B.D. Eter do petróleo	5,9 3,8
14. ^a	*B-D. Eter do petróleo	- 4,7

* Blygh and Dyer

QUADRO 2
PENICILLIUM OXALICUM

Cultura	Solvente	Lípidos totais (%)
1. ^a	* B. D.	-
2. ^a	* B.D. Clorofórmio + metanol (1:1)	- -
3. ^a	Eter do petróleo	3,3
4. ^a	Acetona + metanol (1:1)	26,3
5. ^a	Clorofórmio	1,9
6. ^a	Eter do petróleo Clorofórmio	2,4 3,7
7. ^a	Eter do petróleo Eter etílico Clorofórmio	2,0 5,3 5,3
8. ^a	Eter do petróleo Eter etílico	1,2 4,6
9. ^a	Eter do petróleo Clorofórmio	1,3 4,6
10. ^a	* B.D. * B. D. Eter do petróleo Clorofórmio	2,7 2,6 3,8 3,7
11. ^a	* B. D. * B. D. Eter do petróleo Clorofórmio	2,4 2,4 4,0 1,9
12. ^a	* B. D. Eter do petróleo Clorofórmio	2,0 2,0 7,0
13. ^a	* B. D. Eter do petróleo	1,7 1,1
14. ^a	* B. D. Eter do petróleo	- 1,5
15. ^a	* B. D. Eter do petróleo	1,3 2,0

* Blygh and Dyer

Métodos

O material liofilizado e moído, foi em seguida tratado por diversos solventes para extracção dos lípidos totais e estes depois estudados quanto à sua composição em ácidos gordos por cromatografia em fase gasosa.

Obtenção dos micélios

Manutenção das estirpes

Utilizou-se CZAPEK DOX LIQUID MEDIUM DA OXOID pH = 6,8 ± 0,2 (Cza), no desenvolvimento dos micélios.

Meio de cultura

Os fungos foram mantidos em Malt Extract Agar (Bacto Malt Extract; 20 g; Peptona, 1 g; Dextrose, 20 g; Agar, 20 g), (MEA), e utilizados após 10 dias de incubação a 25 °C.

Inoculação e Incubação

Preparam-se balões de 500 cm³ colocando em cada 300 cm³ do meio de cultura Cza inoculados com 10 cm³ duma suspensão de esporos obtidos dum tubo MEA, em CINA a 0,9% estéril incubados em agitador de vaivém durante 10 dias à temperatura de 30 °C.

Separação e preparação dos micélios

Os micélios foram separados do meio de cultura recorrendo à filtração ou centrifugação e depois liofilizados e moídos.

Extracção dos lípidos totais

Para a extracção dos lípidos utilizaram-se diversas técnicas e diversos solventes.

Extracção a frio

Extracção dos lípidos por uma mistura de metanol/clorofórmio (2:1 v/v) de acordo com a técnica de Blygh and Dyer [1].

Extracção a quente

Extracção dos lípidos totais em aparelho de extracção contínua (Soxhlet) durante 72 horas com 16 horas de refluxo. Utilizaram-se os solventes seguintes:

Éter de petróleo p.e 40° - 60° C
Clorofórmio
Clorofórmio + metanol (2:1)
Clorofórmio + metanol (1:1)
Acetona + metanol (1:1)
Acetona + etanol (1:1)

Extracção e metilação directa pelo método de Lepage (modificado e adaptado às nossas condições de trabalho)[8].

A uma toma de micélio liofilizado de aproximadamente 0,3 g, juntam-se 5 cm³ duma solução de metanol/cloreto de acetilo 19:1. Leva-se o preparado a banho-maria à temperatura de 80 °C durante 1 hora e deixa-se arrefecer. Adiciona-se 1 cm³ de água e 2 cm³ de n-heptano. Transfere-se a camada superior para um tubo de ensaio fazendo passar por SO₄ Na₂ anidro e evapora-se sob refluxo de azoto quase à secura. Obtém-se assim os ésteres metílicos dos ácidos gordos prontos a cromatografar.

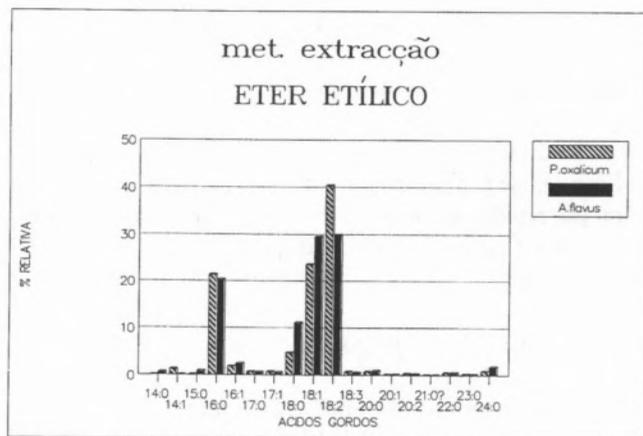


Figura 4

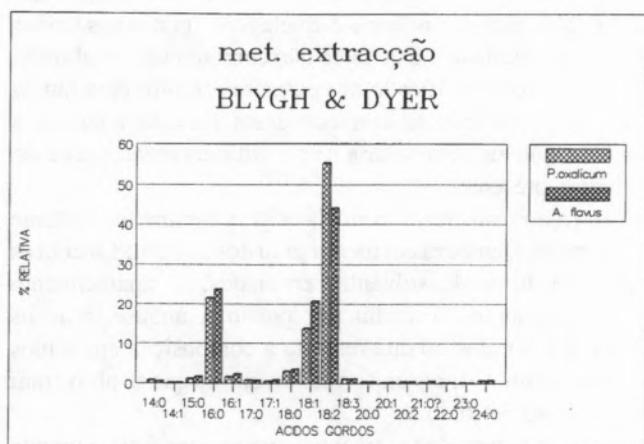


Figura 1

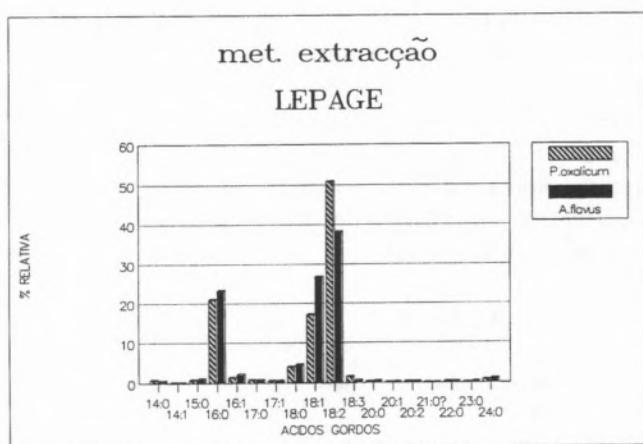


Figura 5

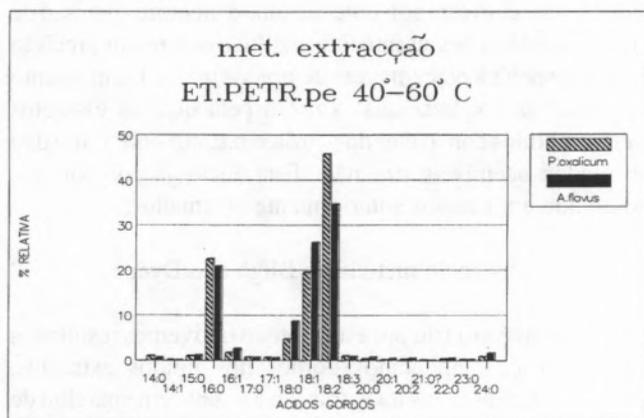


Figura 2

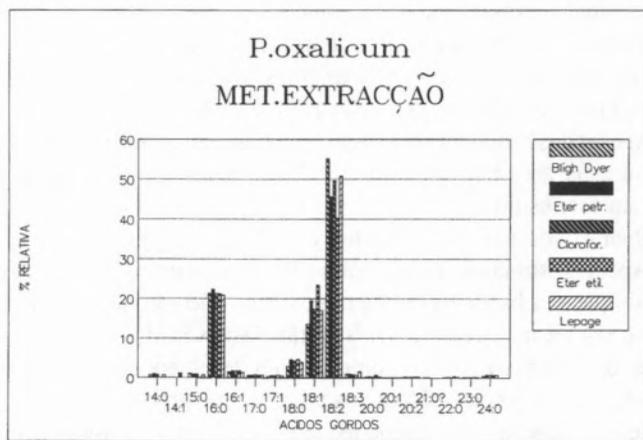


Figura 6

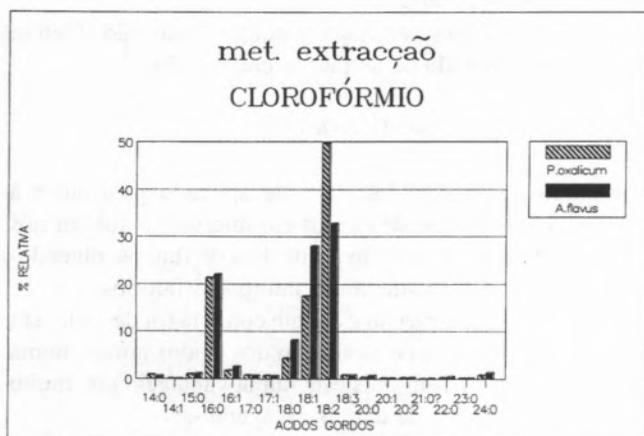


Figura 3

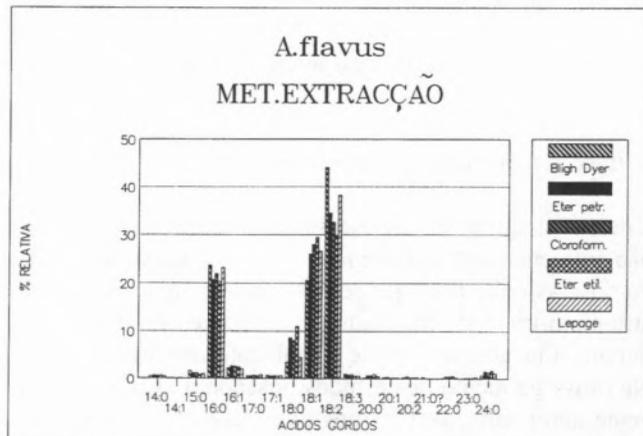


Figura 7

Separação, identificação e doseamento dos ácidos gordos

Preparação dos ésteres metílicos

Na preparação dos ésteres metílicos (exceptuando o método de Lapage), seguiu-se basicamente a técnica de metilação e extracção rápida segundo NP-974, tendo de adaptar o método às condições muito específicas que a análise dos microorganismos exige.

Cromatografia dos ácidos gordos

Foi efectuada por cromatografia gás líquido usando para o efeito um cromatógrafo HEWLETT - PACKARD 5880 A com integrador computadorizado.

Nos ensaios utilizámos colunas de DEGS a 20% em cromosorb W (DMCS) de 80-100 mesh, de 2 m de comprimento, mantida em tudo de aço com diâmetro interno da ordem dos 2 mm, e trabalhámos em condições por nós escolhidas como resultado de anteriores estudos de óleos e gorduras em diversos produtos animais e vegetais.

O cálculo em percentagem dos ácidos gordos foi obtido por integrador computadorizado.

Resultados e discussão

Os resultados constam dos quadros e gráficos que adiante se apresentam.

Supomos ser a primeira vez que em Portugal se publicam dados deste tipo em microorganismos, pelo que lhe atribuímos interesse como informação de base. Pensa-se ser possível em futuro próximo, aprofundar estes conhecimentos, apoiando-nos em técnicas mais avançadas, e logo que seja possível dispor do indispensável equipamento.

Apesar das limitações referidas, é já possível avançar alguma coisa na área que procuramos desenvolver e que se inicia com este estudo.

Quanto aos teores de lípidos totais encontrados nas duas espécies estudadas, considerámo-los muito baixos, e os casos em que se observam teores muito altos não são de considerar pois a maior parte das substâncias extraídas não eram lípidos. Por isso, sob o ponto de vista de obtenção de óleos, estas duas espécies não se nos afiguram de grande interesse, nem era essa a nossa preocupação fundamental; o nosso fim principal era a caracterização dos ácidos gordos desses mesmos lípidos.

Alálise da acção dos diversos métodos e solventes empregados

Extracção a quente em aparelho Soxhlet

É de realçar que os solventes utilizados na extracção a quente não influenciaram grandemente a composição em ácidos gordos. As diferenças que se notaram em algumas culturas atribuímo-las mais às condições alteradas de arejamento, durante a incubação, do que ao solvente empregado.

No prosseguimento dos estudos, visando a escolha do solvente apropriado, verificámos que alguns tiveram que ser eliminados logo à partida. Estão nestas condições as misturas

de solventes empregados na extracção a quente. Este facto deve-se essencialmente à elevada quantidade de substâncias não lipídicas que foram extraídas conjuntamente, como já acima referimos, as quais dificultam o trabalho analítico posterior e falseiam os resultados.

Nalguns casos, o produto extraído apresentou-se sob a forma de uma substância «plástica», onde o prosseguimento das análises era muito dificultado devido à insolubilidade no n-heptano, solvente que seleccionámos para conduzir a metilação dos ácidos gordos, e posterior estudo por cromatografia gasosa.

O éter etílico empregado como solvente de extracção de lípidos em micélios revelou não ser o mais apropriado, já que no exame cromatográfico dos ácidos gordos dá origem a um componente que se sobrepõe ao ácido mirístico (C14), levando-nos a admitir a existência daquele ácido gordo nos lípidos de fungos estudados. Este facto não corresponde à realidade, já que não foi identificado nos extractos obtidos com outros solventes, e o que se conhece desta matéria leva-nos a concluir que ele se revelaria nestas últimas extracções caso estivesse presente.

A extracção com clorofórmio dá origem a extractos bastante pigmentados, embora em menor grau dos que obtidos com as outras misturas de solventes ensaiados. O aparecimento destes pigmentos dificulta um pouco a análise, mas os resultados obtidos no que respeita à composição em ácidos gordos são muito mais uniformes do que os que se obtiveram com éter do petróleo.

Neste caso alguns dados tivemos que rejeitar dado a grande disparidade dos resultados obtidos. Porém os extractos etéreos obtidos com este solvente são quase incolores por isso de muito mais fácil manuseamento analítico e de maior precisão no que respeita à percentagem de lípidos totais. De momento não sabemos explicar qual a razão pela qual os extractos etéreos obtidos com o éter do petróleo p.e. 40° - 60° C ora dão resultados aceitáveis ora não. Este facto já foi por nós observado em estudos anteriormente efectuados.

Extracção a frio pelo método de Bligh and Dyer

Com a extracção a frio por este método obtivemos resultados de composição em ácidos gordos nos lípidos extraídos, bastante diferentes dos da extracção a quente em aparelho de SOXHLET. Assim os teores em ácido linoleico são mais elevados, passando-se o inverso com os ácidos esteárico, oleico, beénico linhocérico.

Os teores em ácido palmítico e palmitoleico não diferem muito com o método de extracção empregado.

Método de Lepage (modificado) [7]

O método de Lepage inicialmente aplicado pelo autor à extracção e metilação de lípidos em microalgas foi por nós adaptado com o mesmo fim a micélios de fungos, obtendo-se resultados que consideramos muito satisfatórios.

É um método de extracção a quente como já foi descrito, em que se faz a extracção e metilação dos ácidos gordos numa mesma operação. Tem pois esta dupla vantagem que muito beneficia em termos de tempo e reagentes.

O método embora pouco ensaiado mostrou no entanto ser

eficiente e rápido e os resultados obtidos na composição em ácidos gordos são semelhantes aos obtidos em aparelho SOXHLET.

Verificámos quando isso foi possível, que numa mesma cultura, o método de extracção a quente ou a frio influenciou a composição em ácidos gordos, mas na extracção a quente com os diversos solventes as diferenças não são muito notáveis, como já aliás referimos.

Comparação das duas espécies estudadas quanto a composição em ácidos gordos dos seus lípidos

Comparando os dois fungos estudados, verificámos que o *A. flavus* tem teor mais elevado de lípidos, e no que se refere à composição em ácidos gordos, o *A. flavus* tem teores mais elevados de ácidos palmitoleico, esteárico, oleico e linhocérico, e menores de ácidos mirístico e linoleico.

Os restantes ácidos gordos têm proporções idênticas. Estes resultados são em nosso entender um contributo válido para ajudar à caracterização taxonómica dos fungos e constituem uma esperança para novos avanços neste domínio.

Comparando os mesmos resultados com os de outros autores [2, 9] verificámos que nem sempre são concordantes e nalguns casos até são bem evidentes as diferenças.

Porém estas diferenças poderão ser encontradas não só nas diferentes condições de desenvolvimento dos fungos nomeadamente o meio de cultura empregado, como no método de extracção de lípidos utilizados, que como nós verificámos tem muita influência na percentagem da composição em ácidos gordos.

Conclusão

Foi evidente a influência do solvente utilizado na percentagem de lípidos extraídos, no conjunto de outros constituintes que são extraídos em simultâneo.

As extracções a quente dão mais rendimento em extracto lípido que as extracções a frio.

Igualmente se verificam diferenças nas gorduras extraídas pelos diversos métodos, no que se refere às suas composições em ácidos gordos. As extracções a frio são mais ricas em

ácido linoleico e nas extracções a quente notam-se teores mais elevados de ácido oleico, esteárico, beénico e linhocérico.

Entre as extracções a quente, utilizando vários solventes, não se notaram diferenças sensíveis quanto à composição em ácidos gordos dos lípidos extraídos.

O método de Lepage (modificado) revelou-se o método mais apropriado para o doseamento dos ácidos gordos, componentes dos lípidos dos microorganismos.

Comparando as características dos dois fungos estudados, verifica-se que o *Aspergillus flavus* se revelou mais rico em extracto lípido e neste os teores de ácidos palmitoleico, esteárico, oleico e linhocérico, são mais elevados, e mais baixos os de mirístico e linoleico.

As diferenças de composição em ácidos gordos que encontramos nos extractos lípidos do *Aspergillus flavus* e *Penicillium oxalicum*, indicam que este processo permite aumentar o número de caracteres que podem ser tidos em conta no aperfeiçoamento e classificação sistemática dos microorganismos.

Agradecimentos

As autoras agradecem à Eng. Técnica Maria Lucília Afonso e à Auxiliar Técnica Alzira Reis, o apoio analítico prestado, e ao auxiliar Técnico José da Silva o apoio prestado na obtenção dos micélios.

Referências

- [1] Bligh, E.G., Dyer, W.J., Can. J. Biochem. Physiol., 1959, 37.
- [2] Farag, R.S., Youssef A.M., Khalil F.A. e Tahara, Zagesig University, Egypt, JAOCS July, 1981, p. 765-768.
- [3] Ferrão, A.M.B.C., ácidos gordos na semente de Acacia rubra (Delonix regia C.) Garcia de Orta, Ser. Est. Agron., 13 (1-2), 1985, 299-302.
- [4] Ferrão, A.M.B.C., Ácidos gordos no óleo de miolo de pinhão, DCEAI n.º 266 ET-47, 1989.
- [5] Ferrão, J.E.M. e Ferrão, A.M.B.C., Nota sobre a composição das sementes de Cucumis ficifolius de Cabo Verde, Garcia de Horta Ser. Est. Agon., 8 (1-2), 1981, 11-16.
- [6] Ferrão, J.E.M. e Ferrão, A.M.B.C., A semente de Camélia paponica L., como oleaginosa, Rev. Cienc. Agrárias 5 (2), 1982, 45-59.
- [7] Ferrão, J.E.M. e Ferrão, A.M.B.C., Ácidos gordos em Moringa oleifera LAM e Moringa ovalifolia DINTER e BERGER, provenientes de Angola, DCEAI n.º 252, ET-45, 1986.
- [8] Lepage, G. Roy, C.R., J. Lipid Res., 1987, 27, 114-9
- [9] Shaw, Robert, The Polyunsaturated Fatty Acids of microorganisms Advances in Lipid Research vol. 4, 1966, pág. 107-121 e 130-136.

49
In
114,82

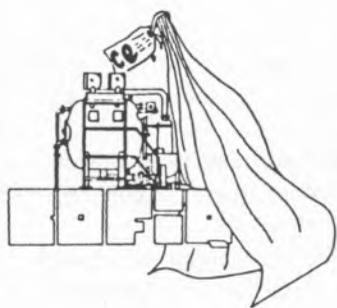
ÍNDIO, do **Azul-indigo** que se vê em espectroscopia; descoberto em 1863. É um metal usado em transistores e como «cola» que adere ao vidro, mas em pequena escala por ser raro. No entanto, baterias de índio minúsculas e de longa duração foram já projectadas para relógios electrónicos de pulso.

50
Sn
118,69

ESTANHO, de **Stannum**, nome latino; pré-histórico. Por ser resistente à corrosão, o estanho tornou-se numa das maravilhas das donas de casa: permitiu a comida enlatada. Uma finíssima camada de estanho recobre o aço das latas de conserva. Produzem-se mais de 40 000 milhões destas latas por ano.

51
Sb
121,75

ANTIMÓNIO, de **Antimonos**, «oposto à solidão» (ocorre em geral associado a outros elementos); o símbolo deriva de **stibium**, ou marca (foi usado antigamente em lápis castanho para sombrear olhos); descoberto em 1450. O antimónio é usado juntamente com o chumbo em baterias e também em ligas metálicas.



PENSAR QUALIDADE

– Uma estratégia de futuro

Este será o tema de uma série de actividades a realizar pelos alunos Finalistas dos Cursos de Química – Ramo Controlo de Qualidade de Matérias Plásticas e Química – Ramo Controlo de Qualidade de Materiais Têxteis, da Universidade do Minho.

Estas licenciaturas são por si só uma experiência inovadora no meio universitário e visam ajudar da melhor forma possível a indústria Portuguesa a alcançar a tão desejada qualidade dos produtos.

"É fundamental compreender porque escolhemos este tema para a realização de um colóquio. "Pensar Qualidade" – porque será com este espírito que Portugal conseguirá ultrapassar as dificuldades encontradas com a abertura do Mercado Único, um mercado tão vasto onde apenas aqueles que se preocupam em produzir "Bem", vencerão o desafio. "Uma Estratégia de Futuro" – porque além de vencer esse desafio é fundamental que a etiqueta Made in Portugal seja sinónimo de confiança e prestígio".

A organização tem como objectivo primordial alertar os empresários e técnicos para a necessidade de um maior contacto e intercâmbio entre Empresas e Universidade.

O colóquio realizar-se-á nos dias 4 e 5 de Abril de 1991 nas recentes instalações da Universidade do Minho em Gualtar, Braga.

O primeiro dia, é dedicado às Empresas do sector de Plásticos. O segundo, será de grande interesse para as Empresas Têxteis. Os temas a abordar serão:

Plásticos

- "Técnicas Expeditas de Controlo e Caracterização de Matérias Primas"
Doutor Cruz Pinto (Universidade do Minho)
- "Propriedades Barreira de Filme de Polietileno: Efeitos de Processamento"
Jan Rijken (DSM)
- "Controlo de Polióis nas Resinas de Poliuretano"
Eng^o Jaime de Matos (BASF)
- "Injecção de Termoplásticos Técnicos: Qualidade e Controlo do Processo"
Ignácio Morillo (DuPont)
- "Controlo de Qualidade de Embalagens Alimentares"
Eng^a Isilda Neves Andrade (LNETI)

- "Plásticos: Segurança na Qualidade - Métodos de Ensaio"
Eng^o Juan Navarro (Hoechst Ibérica)

Têxteis

- "Controlo de Qualidade em Geral"
Eng^a Adriana Machado (Tarf) e
Eng^o Carlos Lucas Afonso (Somelos)
- "Controlo de Intermediários na Estampagem"
Eng^o Fernando Calado (Coelima)
- "Os Corantes e a Indústria do Presente"
Eng^o Carlos Travasso (Sandoz)
- "Gestão da Qualidade"
Eng^o António Almeida Júnior (Associação Portuguesa de Qualidade)
- "Normalização e Controlo de Qualidade"
Dr^a Helena Andrade (CITEVE)

"Embora os dois dias se destinem a duas áreas bastante distintas da indústria, o problema da qualidade traduz-se em carências a nível produtivo actualmente bem patentes em ambos os sectores".

O Colóquio será apoiado pelo lançamento de duas Revistas. O primeiro número foi editado no mês de Janeiro de 1991, e o segundo, será distribuído nos dias do Colóquio, conterá artigos específicos e voltados para os actuais problemas que o meio empresarial, Têxtil e de Plástico, enfrenta na concepção de produtos com qualidade.

"É nosso propósito fazer com que estas iniciativas sejam um primeiro levantamento dos principais obstáculos que se colocam à obtenção da qualidade desejada para os produtos. Vamos, a partir de agora, produzir uma nova qualidade, uma qualidade portuguesa que se vai impor na Europa do futuro".

Destinatários

- Empresários e Técnicos
- Directores de Laboratório
- Directores de Qualidade
- Directores de Produção
- Universitários

Todos os interessados devem entrar em contacto com a COFIQ - Comissão de Finalistas de Química:
COFIQ - Comissão de Finalistas de Química
Universidade do Minho
Largo do Paço
4719 BRAGA CODEX
Telefax: (053) 61 23 67