



Produção simultânea de biomassa e lipídeos utilizando meios contendo resíduos agroindustriais por *Mucor subtilíssimus* (UCP/WFCC 1262), *Cunninghamella echinulata* (UCP/WFCC 1299) e *Rhizopus microsporus* (UCP/WFCC 1304) isolados do solo da Caatinga de Pernambuco

Simultaneous production of biomass and lipids using media containing agro-industrial residues by *Mucor subtilíssimus* (UCP / WFCC 1262), *Cunninghamella echinulata* (UCP / WFCC 1299) and *Rhizopus microsporus* (UCP / WFCC 1304) isolated from the soil of the Pernambuco Caatinga

Miller da Costa Lima¹

Tayane de Cássia Dias Mendes Silva²

Adriana Ferreira de Souza³

Marcos Antônio Cavalcanti Luna⁴

Rosileide Fontenele Silva Andrade⁵

Carlos Alberto Alves da Silva⁶

Kaoru Okada⁷

¹ UNICAP – Universidade Católica de Pernambuco

² UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco

³ UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco

⁴ UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco

⁵ UNICAP – Universidade Católica de Pernambuco

⁶ UNICAP – Universidade Católica de Pernambuco

⁷ UNICAP – Universidade Católica de Pernambuco

Resumo: Os lipídeos microbianos são óleos e/ou gorduras produzidos por micro-organismos, sendo similares em tipo e composição aos óleos e gorduras produzidos por animais e plantas. Foram realizados estudos buscando produzir lipídeos de fungos mucorales isolados da Caatinga em meios contendo diferentes concentrações de melaço de cana de açúcar, milhocina e pH. A amostra com elevado potencial na produção de biomassa e lipídeos, foi cultivada utilizando um planejamento fatorial 2³. Os rendimentos das biomassas foram calculados por gravimetria, os lipídeos totais quantificados e a identificação dos ácidos graxos foram realizados por cromatografia gasosa. Um estudo histoquímico foi realizado com a amostra selecionada. Os resultados obtidos demonstraram que a amostra de *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299 apresentou uma elevada produção de biomassa (9,05g/L) e lipídeos totais (46,96%) no meio contendo 10% de melaço de cana de açúcar, 5% de milhocina, pH 6. No planejamento realizado (ensaio 4) utilizando o meio constituído de milhocina (8%), melaço de cana de açúcar (12%) e pH 6,0, ocorreu máxima concentração de biomassa (10,1g/L) e lipídeos totais (47,86%). A partir da biomassa produzida foi observada uma produção de ácidos graxos com cadeias entre 14 e 20 carbonos.

Palavras-Chave: bioprodutos microbianos, formulação meios, resíduos agroindustriais.

Abstract: Microbial lipids are oils and / or fats produced by microorganisms, being similar in type and composition to the oils and fats produced by animals and plants. Studies were carried out aiming the production of lipids of mucoral fungi isolated from Caatinga in media containing different concentrations of sugarcane molasses, maize and pH. The sample with high potential in the production of biomass and lipids, was cultivated using a factorial design 2³. The biomass yields were calculated by gravimetry, the total lipids quantified and the identification of the fatty acids was performed by gas chromatography (GC). In addition, a histochemical study was performed with the selected sample. The results showed that *Cunninghamella echinulata* UCP / WFCC 1299 was the sample that showed a high simultaneous production of biomass (9.05g / L) and total lipids (46.96%) in the medium containing 10% sugar cane molasses and (8%), sugarcane molasses (12%) and pH 6.0, the maximum concentration of biomass (10.1 g / L) and total lipids (47.86%). From the biomass produced a production of fatty acids with chains between 14 and 20 carbons was observed.

Keywords: microbial bioproducts, media formulation, agroindustrial wastes.

1 Introdução

O cultivo de micro-organismos em bioprocessos submersos ou sólidos tem a finalidade de produzir bioprodutos aplicáveis em diversos setores industriais. Assim, os estudos com a obtenção de lipídeos e proteínas por via microbiana vêm crescendo, pela grande variedade de produtos obtidos e elevados rendimentos econômicos (Soares et al., 2010; Zen et al., 2014; Reinehr, 2016).

A produção de moléculas com características eficientes para a produção de biocombustíveis, vem sendo uma alternativa eficiente bastante pesquisada. Os micro-organismos são capazes de produzir biocombustíveis (bioetanol, biodiesel e biogás), que vem sendo bastante utilizados no cenário mundial. Devido a ser uma energia vantajosa, não provocar grandes impactos ambientais e não produzir substâncias perigosas, caracterizando-se como um processo limpo (Antunes; Silva, 2011; Oliveira; Batista, 2015).

Assim, a produção de biomassa fúngica utilizando resíduos agroindustriais como fontes de carbono e nitrogênio, tem sido considerada uma alternativa viável na produção simultânea de bioprodutos de alto valor agregado como lipídeos e enzimas (Albuquerque, 2003; De paris et al., 2010, Amorin, 2011; Zen et al., 2014).

Os substratos de origem agroindustrial são considerados promissores nos processos fermentativos, tanto por fermentação submersa, como em estado sólido, devido possuírem um elevado valor nutritivo em suas moléculas. Portanto, os resíduos agroindustriais vêm sendo empregados como fontes carbono e nitrogênio favorecendo o crescimento microbiano e a produção de metabólitos secundários (Makkar; Cameotra; Banat, 2011; Meneses, 2016).

A substituição de nutrientes sintéticos por fontes renováveis como glicerol, melão de cana de açúcar, óleos pós-frituras, milhocina e materiais lignocelulósicos têm sido utilizados e contribuem favoravelmente para a redução dos custos de produção e a minimização dos descartes de resíduos agroindustriais no meio ambiente sem tratamento prévio (Cerqueira et al., 2010; Imura et al., 2013; Meneses, 2016).

Os lipídeos microbianos são importantes bioprodutos produzidos fungos, em termos de estrutura, constituição da membrana, retículo endoplasmático e das membranas de várias organelas; substâncias de reserva, principalmente em forma de triglicerídeos. Muitos estudos têm demonstrado a importância de lipídeos microbianos para o desenvolvimento, esporulação e germinação e seu envolvimento em vários processos fisiológicos (Putzke, Putzke, 2004; Pupin et al., 2000; Gao et al, 2013).

2 Material e métodos

2.1 Micro-organismos

Foram utilizados *Mucor subtilissimus* UCP/WFCC 1262, *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299 e *Rhizopus microsporus* UCP/WFCC 1304 isolados de amostras do solo da Caatinga. As linhagens encontram-se mantidas no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), da Universidade Católica de Pernambuco, registrado no World Federation for Culture Collection (WFCC).

2.2 Resíduos Agroindustriais

Foram utilizados o melaço de cana-de-açúcar procedente do processo de fabricação de aguardente de cana de açúcar e a milhocina obtida a partir do processo de refinação do milho.

2.3 Condições de cultivo

Todas as amostras de fungos foram crescidas no meio Batata Dextrose Agar (BDA) (0,3 g/L de caldo de batata, 20g/L de dextrose, 18g/L de Agar) com pH 5,5 e incubadas a 28°C, durante 96 h. Após esse período, os esporângios foram transferidos para água destilada estéril e em seguida, foi determinado o número de células em câmara de Neubauer (10^7 esporos/mL). Esta suspensão foi utilizada como inóculo.

2.4 Produção de biomassa e lipídeos

A produção de biomassa e lipídeos foi realizada em frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meios constituídos por diferentes concentrações de milhocina, melaço de cana-de-açúcar em diferentes pH de acordo com o planejamento experimental (Tabela 1). Em todos os ensaios foram adicionados 1% do inóculo contendo 10^7 esporos/mL. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150 rpm, durante 96 h, à temperatura de 28°C. Após este período, foram filtrados para separação do líquido metabólico e biomassa. O Synthetic Medium for Mucorales-SMM (Hesseltine e Anderson, 1957) foi utilizado como controle.

Tabela 1 - Níveis de melaço de cana de açúcar e milhocina para a produção de biomassa e lipídeos

Ensaio	Milhocina (%)	Melaço de cana de açúcar (%)
1	5	5
2	5	10
3	10	5
4	10	10

2.5 Obtenção da biomassa fúngica

A massa micelial foi obtida através de filtração (filtro com 120 mesh), lavada com água destilada, e em seguida, liofilizada e transferida para o dessecador até peso constante e o rendimento expresso em g/L.

2.6 Avaliação histoquímica através de Coloração de Sudan Black

As amostras de *M. subtilissimus* UCP/WFCC 1262, *C. echinulata* UCP/WFCC 1299 e *R. microsporus* UCP/WFCC 1304 foram lavadas com solução tampão fosfato PBS, fixadas em paraformaldeído (37%) por 1 h, pH 7,2. Em seguida, lavadas em tampão fosfato (PBS) e imersas no corante Sudan Black por 10 min, na ausência de luz. Posteriormente, foi retirado o excesso do corante em álcool a 70% e com água destilada estéril. Após a coloração em Sudan Black as amostras foram contra coradas com safranina a 0,5% por 30 s, em seguida foi utilizada a solução de PBS para a remoção do excesso de safranina. Por fim as amostras foram observadas por microscopia e os corpos lipídicos foram fotografados em lentes objetivas de até 100x.

2.7 Extração de lipídeos totais

Os lipídeos totais foram extraídos pelo método de Manocha et. al., (1980), onde utilizando 1g de biomassa e um sistema de solventes clorofórmio: metanol (2:1; 1:1; 1:2 v/v) empregando extrações sucessivas. Os extratos foram obtidos através de agitação manual por 15 min, posteriormente centrifugados a 5000g, por 10 min e a biomassa submetida a uma nova extração. Os extratos foram reunidos e evaporados à vácuo. Em seguida a produção de lipídeos foi calculada em relação a biomassa inicial e o teor de lipídeos (g /L) ou lipídeos totais (%), de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Rendimento Percentual Lipídeos Totais (\%)} = \frac{\text{massa de lipídeos (g)}}{\text{biomassa seca(g)}} \times 100$$

2.8 Metilação dos lipídeos

A metilação dos ácidos graxos foi realizada de acordo com Durham e Kloos (1978), a partir de 10 mg de biomassa seca adicionada de 3 mL da solução de trifluoreto de boro, metanol a 14% e 3 mL de benzeno, sendo este último removido e evaporado em atmosfera de nitrogênio. Os ácidos graxos convertidos em ésteres de metila foram suspensos em hexano.

2 Resultados e discussão

3.1 Produção de biomassa e lipídeos totais por fungos da ordem mucorales

As amostras de Mucorales (*M. subtilissimus* UCP/WFCC 1262, *C. echinulata* UCP/WFCC 1299 e *R. microsporus* UCP/WFCC 1304), foram investigadas quanto ao potencial na produção de biomassa e lipídeos totais. De acordo com os resultados obtidos (tabela 2), foi possível concluir que a *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299 demonstrou maior potencial de produção de biomassa (9,05g/L) e lipídeos totais (46,96%) no ensaio 2, (10% de melaço de cana-de-açúcar e 5% de milhocina, com o pH 6).

Tabela 2 – Seleção por (*M. subtilissimus* UCP/WFCC 1262, *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299 e *Rhizopus microsporus* UCP/WFCC 1304) com maior produção de biomassa e lipídeos totais.

Micro-organismos	Ensaio	Biomassa (g/L)	Lipídeos totais (%)
<i>M. subtilissimus</i>	1	0,35	-
	2	3,55	-
	3	1,9	-
	4	1,4	-
<i>Cunninghamella echinulata</i>	1	7,3	20,54
	2	9,05	46,96
	3	7,8	25,64
	4	5,85	8,54
<i>R. microsporus</i>	1	5,6	4,5
	2	5,75	7
	3	5,55	4
	4	5,3	2

3.2 Estudo histoquímico de lipídeos em *M. subtilissimus* UCP 1262, *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299 e *R. microsporus* UCP 1304 utilizando o método de Sudan Black B

A coloração de corpos lipídicos em fungos usando o corante Sudan Black foi descrita pela primeira vez por Burdon (1946), sendo ultimamente utilizada para analisar esses compostos nas células através de uma análise qualitativa, visando investigar a presença de micro-organismos oleaginosos (Prasanna et al., 2011; Neema et al., 2013).

De acordo com a figura 1 A, é possível verificar que a *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299 crescida no meio contendo os substratos alternativos (milhocina e melaço de cana-de-açúcar) (MCM) apresentou o maior acúmulo notável de lipídeos no micélio, verificado pelo aparecimento da coloração roxa/azul escura pelo corante lipofílico Sudan Black, por outro

lado é possível notar que a mesma crescida no meio de cultura (SMM) (Controle), houve o acúmulo de lipídeos, porém em menor quantidade.

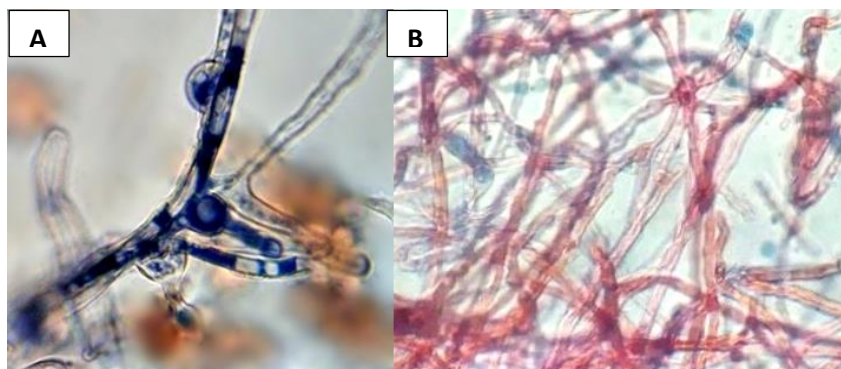


Figura 1 - A - Estudo histoquímico do micélio da *C. echinulata* UCP/WFCC 1299 nos meios de culturas (MCM) - A - (MCM) e (SMM) - B.

A partir dos resultados obtidos nos testes histoquímicos, através de uma avaliação qualitativa que a amostra de *C. echinulata* UCP 1299, foi considerada a melhor produtora de lipídeos em relação aos demais fungos testados, tendo como a próxima etapa a execução de um planejamento fatorial 2^3 para determinar a melhor condição de produção e quantificação dos lipídeos totais.

3.3 Produção de biomassa e lipídeos totais por *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299 utilizando planejamento fatorial 2^3

A partir do meio selecionado (5% milhocina e 10% melaço de cana-de-açúcar), (Tabela 2), foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 com variações das concentrações de milhocina, melaço de cana de açúcar e pH com variável resposta produção de biomassa e lipídeos totais por *C. echinulata* UCP/WFCC 1299 (Tabela 3). Os resultados obtidos demonstraram que a máxima produção de biomassa (10,1g/L) e lipídeos totais (47,86%) ocorreu na condição 4 em meio constituído por melaço de cana de açúcar (12%), milhocina (8%) e pH 5. Os rendimentos de biomassa (6,9g/L) e lipídeos (25,1%) descritos por Bellou *et al.*, (2012) utilizando a *C. echinulata* ATHUM 4411 cultivada em meio contendo glicerol como fonte de carbono foram inferiores aos obtidos no presente estudo.

Tabela 3 - Produção de biomassa e lipídeos totais por *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299 em meio contendo diferentes níveis de milhocina, melaço de cana de açúcar e pH, a partir do planejamento fatorial 2^3

Ensaio	Milhocina (%)	Melaço de cana (%)	pH	Biomassa (g/L)	Lipídeos totais (%)
1	2	8	5.0	4,7	27,58
2	2	12	5.0	2,0	20,00
3	8	8	5.0	4,1	24,70

4	8	12	5.0	10,1	47,86
5	2	8	7.0	1,7	14,82
6	2	12	7.0	2,4	27,28
7	8	8	7.0	1,3	17,40
8	8	12	7.0	2,1	19,52
9	5	10	6.0	2,6	26,08
10	5	10	6.0	2,3	18,60
11	5	10	6.0	2,7	25,54
12	5	10	6.0	4,4	23,80

3.4 Efeito da milhocina, melão de cana de açúcar e pH, na produção de biomassa e lipídeos totais por *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299

O diagrama de Pareto apresentado na Figura 2, com o grau de confiança de 95%, demonstra o efeito das concentrações de melão de cana-de-açúcar, milhocina e pH, assim como suas interações, na produção de biomassa e lipídeos totais por *C. echinulata* UCP/WFCC 1299.

Para a produção de biomassa, Figura 2A demonstrou que as três variáveis influenciaram no aumento de produção da biomassa, do ponto de vista estatístico. No entanto, o pH e a associação entre melão de cana de açúcar e milhocina foram quem mais influenciou no aumento da produção de biomassa. Por outro lado, Figura 2B mostra que as três variáveis foram significativas para a produção. Porém, o elevado rendimento de lipídeos foi mais significativo estatisticamente devido as concentrações de melão de cana de açúcar estudadas neste trabalho.

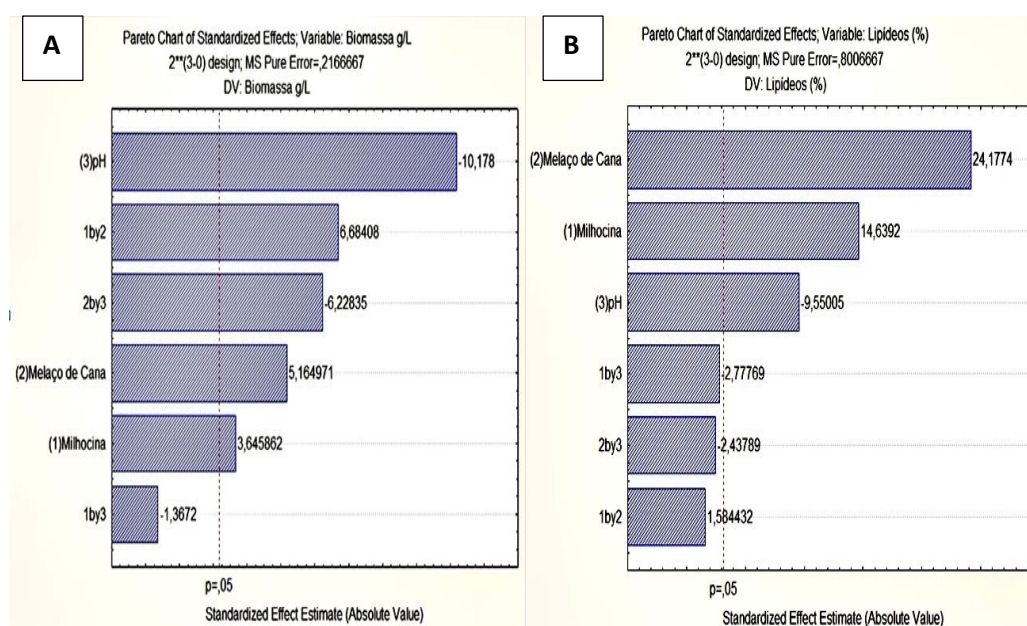


Figura 2 - Diagrama de Pareto para análise do melaço de cana de açúcar, milhocina e pH na produção de biomassa (A) e lipídeos totais (B) por *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299

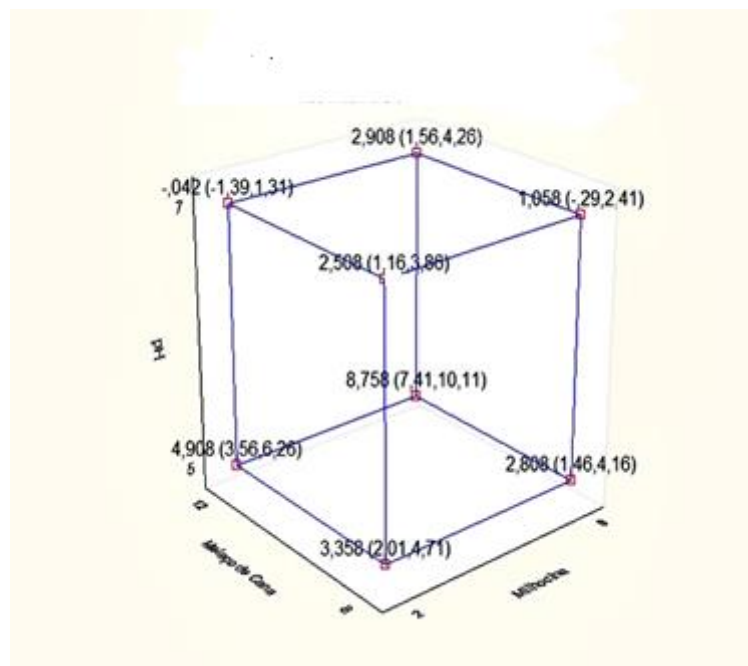


Figura 3 - Gráfico de Cubo para análise das interações do melaço de cana-de-açúcar, milhocina e pH na produção da biomassa por *Cunninghamella echinulata* UCP/WFCC 1299

Para a produção de biomassa, figura 3 demonstrou que a interação da máxima concentração de melaço de cana-de-açúcar 12%, e milhocina 8% foram significativas para a máxima produção de biomassa. No entanto a interação da mínima concentração do pH 5, e a máxima concentração de melaço de cana-de-açúcar 12% também influenciou na máxima produção da biomassa.

3.5 Caracterização dos ácidos graxos

3.5.1 Cultivo em Meio Sintético para Mucorales (Synthetic Medium for Mucorales) e em meio de substratos alternativos

Os resultados obtidos após a extração e metilação dos ácidos graxos da biomassa seca da *C. echinulata* UCP/WFCC 1299 cultivada em meio sintético para Mucorales, e em meio constituído de substratos alternativos (Milhocina+Melaço de cana-de-açúcar - MCM) estão descritas na Tabela 4, que apresenta a concentração de ácidos graxos extraído da biomassa de *C. echinulata* UCP/WFCC 1299 cultivada em meio sintético (Synthetic Medium for Mucorales – SMM) e em meio de substratos alternativos, constituído de melaço de cana-de-açúcar a 12% e milhocina a 8% - CMC, em temperatura de 28° C e pH de 5.

Tabela 4. Composição de ácidos graxos identificados no lipídeo extraído da biomassa seca de *C. echinulata* UCP/WFCC 1299, cultivada em meio sintético para Mucorales - SMM e meio de substratos alternativos - MCM, em 28° C e pH 5, por 96h.

Ácidos graxos	SMM	MCM
Ácido palmítico (C _{16:0})	19,97 %	21,17%
Ácido esteárico (C _{18:0})	4,51 %	10,62%
Ácido docosanoico (C _{22:0})	1,94 %	3,09%
Ácido nervônico (C _{24:0})	1,99 %	-
Ácido palmitoleico (C _{16:1})	1,40 %	2,14%
Ácido oleico (C _{18:1})	42,26 %	27,98%
Ácido linoléico (C _{18:2})	11,57%	25,42%
Ácido linolênico (C _{18:3})	2,2%	2,13%
Ácido graxo não identificado	14,14%	7,45%

Na Tabela 4, estão descritos os maiores picos alcançados nas análises cromatográficas dos ácidos graxos da *C. echinulata* UCP/WFCC 1299 cultivada em glicose - SMM, foram do ácido oleico (C_{18:1}) seguido do ácido palmítico (C_{16:0}) e do linoléico (C_{18:2}).

O cultivo do fungo *C. echinulata* UCP/WFCC 1299 em melão de cana-de-açúcar a 12% e milhocina a 8% - MCM, em temperatura de 28° C e pH de 5, por 96h, verificou-se a presença dos seguintes ácidos graxos: Ácido palmítico (C_{16:0}), Ácido esteárico (C_{18:0}), Ácido docosanoico (C_{22:0}), Ácido palmitoleico, Ácido oleico (C_{18:1}), Ácido linoleico (C_{18:2}) e Ácido linolênico (C_{18:3}). Os maiores percentuais observados nas análises cromatográficas foram dos ácidos oleico, linoleico e palmítico. Este perfil de ácidos graxos se assemelha aos dos óleos convencionalmente utilizados para a produção de biodiesel (carvalho et al., 2013).

Foram obtidos resultados superiores, em relação aos estudos realizados por Janakiraman et al., (2014), que utilizaram o fungo *C. blakesleeana* também cultivado em glicose, e obteve 20% de ácido oleico. Segundo a literatura o ácido oleico é um importante ácido graxo utilizado, como matéria-prima na produção de biodiesel.

A elevada quantidade de ácidos graxos saturados e insaturados principalmente (C_{18:1}), (C_{18:2}) e (C_{16:0}) indicam que esse óleo possui potencial como matéria-prima para produzir um combustível de qualidade como alternativa ao diesel convencional. Também, foi observado um teor considerável do ácido esteárico (C_{18:0}), de 10,62 % pela *C. echinulata* UCP/WFCC 1299, se comparada ao cultivo da mesma em meio sintético padrão (4,51 %). Segundo estudos realizados, o ácido esteárico possui relevante importância nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos.

Foram analisados os resultados do cultivo da *C. echinulata* UCP 1299, em um meio alternativo constituído por 12% de melão de cana-de-açúcar e 8% de milhocina, obtendo uma

presença significativa dos seguintes ácidos: oleico (27,98 %), palmítico (21,17%) e linoleico (25,42 %).

Segundo Rodriguez (2011), o ácido linoleico, pode ser utilizado na indústria farmacêutica, por apresentar um elevado potencial rápido de cicatrização de feridas, por abreviar a fase inflamatória quando ingerido. Ainda o mesmo autor, indica que a ingestão de ácido oleico modula a fase inflamatória, porém o reparo tecidual não é significativo quanto o uso de ácido oleico. O tratamento tópico está relacionado a hidratação e elasticidade da pele que impede a entrada de micro-organismos patogênicos e a perda de água para o meio externo. Sendo assim, o ácido linoleico apresenta um elevado potencial em tratamento de feridas tópicas de pele.

4 Conclusão

Os resultados obtidos nestes estudos sugerem que *C. echinulata* UCP/WFCC 1299, foi capaz de produzir biomassa e lipídeos a partir da bioconversão da milhocina e do melão de cana de açúcar presentes na composição do meio alternativo formulado. Desta forma, esses estudos contribuem como mais uma alternativa viável para produção destes bioprodutos de interesse industrial a partir da reutilização de resíduos agroindustriais, contribuindo assim, para minimização dos problemas ambientais.

Os resultados obtidos nos experimentos de coloração de Sudan Black evidenciam, qualitativamente, a acumulação de lipídeos no interior das células, pois o corante lipofílico ao difundir-se a partir da membrana citoplasmática cora o citoplasma em corpos lipídicos (CLs), provocando o aparecimento de inclusões citoplasmáticas de estoque lipídico, em regiões escuras. Através desses resultados, não será viável a utilização dos demais fungos testados, pois não apresentam resultados satisfatórios de produção de biomassa e lipídeos, como a *C. echinulata* UCP/WFCC 1299.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, FACEPE, CAPES e a UNICAP, pelo suporte financeiro para realização desse trabalho, e ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) pela infraestrutura da execução de toda parte experimental.

6 Referências bibliográficas

ALBUQUERQUE, P. M. Estudo da produção de proteína microbiana a partir do bagaço de maçã. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Santa Catarina, 2003.

ALONSO, D. L., MAROTO, F. G. Plants as ‘chemical factories’ for the production of polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 6, p. 481-497, 2000.

AMORIM, G. M. Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal. **Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia**, Itapetinga, Bahia, v. 77, 2011.

ANTUNES, R., SILVA, I. C. O papel dos microorganismos no futuro dos biocombustíveis. **Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI**. 2011. Disponível em: http://www.marcaspatentes.pt/files/collections/pt_PT/1/300/302/O%20Papel%20dos%20Microorganismos%20no%20futuro%20dos%20Biocombust%20C3%ADveis.pdf; Acesso em: 07 dez. 2016.

BALDOTTO, M. A., BALDOTTO, L. E. B. Ácidos húmicos. **Revista Ceres**, v. 61, p. 856-881, 2014.

BANAT, I. M., SATPUTE, S. K., CAMEOTRA, S. S., PATIL, R., NYAYANIT, N. V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants’ production., **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. December, p. 697, 2014.

BURDON KL. Material Gorduroso em Bactérias e Fungos Revelados por Coloração Secas, Preparações de Fecho Fixo. **J Bacteriol.** v. 52 , n.6, 665-678, 1946.

CARVALHO, T. F. O. Modernização agrícola e a região da Alta Mogiana Paulista: análise da expansão da produção de cana-de-açúcar em uma tradicional região cafeeira. 2014. 141f. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Instituto de Geociências e Ciências Exatas do Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho,Rio Claro, 2014.

DOS SANTOS, S. C., FERNANDEZ, L. G., ROSSI-ALVA, J. C., ROQUE, M. R. A. Evaluation of substrates from renewable-resources in biosurfactants production by *Pseudomonas* strains. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 35, 2010.

CORDEIRO, E. F. Efeito das condições de cultivo na composição de ácidos graxos produzidos pelas leveduras *Candida fabianii* e *Trichosporon brassicae*. (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 1997..

DE PARIS, L. D., SCHEUFELE, F. B., JÚNIOR, A. T., GUERREIRO, T. L., HASAN, S. D. M. Estudo do crescimento de *A. asiellus* em farelo de soja convencional para produção de enzimas. **Estudos Tecnológicos Em Engenharia**, v. 6, n. 1, p. 22-35, 2010.

DURHAM, D. R., KLOOS, W. E. Comparative Study of the Total Cellular Fatty Acids of *Staphylococcus* Species of Human Origin. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 223-228, 1978.

IMURA, T., KAWAMURA, D., MORITA, T., SATO, S., FUKUOKA, T., YAMAGATA, Y., TAKAHASHI, M., WADA, K., KITAMOTO, D. Production of Sophorolipids from Non-edible Jatropha Oil by *Stamerella bombicola* NBRC 10243 and Evaluation of their Interfacial Properties. **Journal of Oleo Science**, v. 62, n. 10, p. 857–864, 2013.

JAPE, A., HARSULKAR, A., SAPRE, V. R. Modified Sudan Black B staining method for rapid screening of oleaginous marine yeasts. **International journal of current microbiology and applied sciences**, v. 3, n. 9, p. 41-46, 2014.

MAKKAR, C., An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, n. 58, p.428–434, 2002.

MANOCHA, M. S., SAN-BLAS, G., CENTENO, S. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. **Microbiology**, v. 117, n. 1, p. 147-154, 1980.

MENESES, D. P. Produção de biossurfactante por *Aureobasidium thailandense* utilizando resíduos agroindustriais. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

MENG, X., YANG, J., XU, X., ZHANG, L., NIE, Q., XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable energy**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 2009.

MURUGAN, S., ARNOLD, D., PONGIYA, U. D., NARAYANAN, P. M. Production of xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 6915 using saw dust as substrate under solid state fermentation. **Enzyme Research, London**, v. 2011, p. 1-7, 2011.

OLIVEIRA, L. R., BATISTA, R. D. Perspectivas e situação atual da produção de biocombustíveis. **Revista Eletrônica de Energia**, v. 5, n. 1, 2015.

PUPIN, A. M., MESSIAS, C. L., PIEDRABUENA, A. E., ROBERTS, D. W. Total lipids and fatty acids of strains of *Metarhizium anisopliae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 121-128, 2000.

PUTZKE, J., PUTZKE, M. T. L. Os Reinos dos Fungos Vol. 2. 2002.

RATLEDGE, C. Microbial production of gamma-linolenic acid. **Handbook of Functional Lipids**. edited by C. Akoh, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 19, 2005.

RATLEDGE, C. Single cell oils — have they a biotechnological future? **Trends In Biotechnology**, [s.l.], v. 11, n. 7, p.278-284, jul. 1993. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-7799\(93\)90015-2](http://dx.doi.org/10.1016/0167-7799(93)90015-2).

RODRIGUES, H.G. Modulação do processo de cicatrização pelos ácidos oléico e linoléico. **Tese de Doutorado**. Pós-graduação em Fisiologia Humana. Universidade de São Paulo (USP). 2011.

STROPARO, E. C., BEITEL, S. M., RESENDE, J. T. V., KNOB, A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico, **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2267-2278. 2012.

TAPIA, V. E., ANSCHAU, A., CORADINI, A. L.V., FRANCO, T. T., DECKMANN, A. C. Optimization of lipid production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* by random mutagenesis coupled to cerulenin screening. **Amb Express**, v. 2, n. 1, p. 64, 2012.

VICENTE, G., BAUTISTA, L. F., GUTIÉRREZ, F. J., RODRÍGUEZ, R., MARTÍNEZ, V., RODRÍGUEZ-FRÓMETA, R. A., RUIZ-VÁZQUEZ, R. M., TORRES-MARTÍNEZ, S., GARRE, V. Direct transformation of fungal biomass from submerged cultures into biodiesel. **Energy & Fuels**, v. 24, n. 5, p. 3173-3178, 2010.

ZEN C. K., SILVA K. P., REINEHR C. O., BERTOLIN T. E., COLLA L. M. Indução da síntese de lipídeos e proteínas por *Aspergillus niger*. **Revista CIATEC-UPF**, v. 6, n. 2, p. 40-47, 2014.