



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**JOSENILDA CARLOS DOS SANTOS**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS  
FILAMENTOSOS CELULOLÍTICOS ISOLADOS DE  
RESTINGA**

**CRUZ DAS ALMAS  
2012**

**JOSENILDA CARLOS DOS SANTOS**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS  
FILAMENTOSOS CELULOLÍTICOS ISOLADOS DE  
RESTINGA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Centro de Ciências Agrárias,  
Ambientais e Biológicas da Universidade  
Federal do Recôncavo da Bahia para  
obtenção do título de bacharel em Ciências  
Biológicas.

**Orientadores: Prof. Dr. Rodrigo P. do  
Nascimento**

**Prof. Dr. Phellippe A. S. Marbach**

**CRUZ DAS ALMAS  
2012**

## Ficha Catalográfica

S237 Santos, Josenilda Carlos dos.

Potencial biotecnológico de fungos filamentosos celulolíticos isolados de restinga / Josenilda Carlos dos Santos.\_ Cruz das Almas - Ba, 2012.

88 f.; il.

Orientador: Rodrigo Pires do Nascimento.

Coorientador: Phellippe Arthur Santos Marbach.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

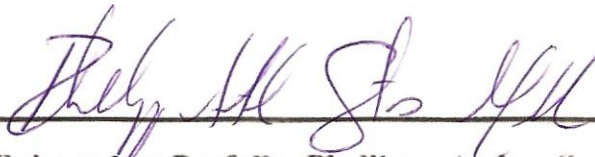
**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**JOSENILDA CARLOS DOS SANTOS**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS  
CELULOLÍTICOS ISOLADOS DE RESTINGA**

**Aprovado em: 03 de março de 2012**

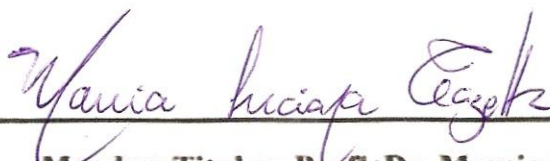
**BANCA EXAMINADORA**



---

**Orientador: Prof. Dr. Phellippe Arthur Santos Marbach**

**Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB**



---

**Membro Titular: Prof. Dr. Marcia Luciana Cazetta**

**Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB**



---

**Membro Titular: MSc. Aline Simões da Rocha Bispo**

**Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS**

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade da vida, por me dar uma segunda chance e por me conceder a força necessária para seguir em frente diante das dificuldades.

Aos meus pais por seu amor incondicional, por entender minha ausência em diversos momentos, por me dar todo o suporte para que eu pudesse concluir meu curso e por sempre ter me encorajado a nunca desistir de meus sonhos. Meus heróis!

Aos meus irmãos Diogo, Carlos, Igor, Antonio, João, Manoel pelo carinho e pelo cuidado. E, principalmente, à Bené (irmão, amigo, companheiro) que sempre acreditou em mim e mesmo estando longe sempre se fez presente. Vocês são os homens da minha vida!

Aos meus amigos Verônica, Binha, Uiram, Juliana, Welington, Markinhos, Barbara e Rube, por trazer alegria, inspiração e motivação nos meus piores momentos, por suportar minhas crises e entender quando eu dizia “Eu não posso ir”. Amizade assim não tem preço!

Aos Professores Rodrigo Pires do Nascimento e Phellippe A. S. Marbach, pela orientação e confiança. Vocês me ensinaram muito!

A todos os amigos do Laboratório: Mariza, Daniele, Vinicius, Aline, Jackeline, Fernanda, Paulo, Valter, Diogo e tantos outros que já passaram por lá. Obrigada pela convivência diária, pela ajuda constante, por terem se preocupado junto comigo, pelos momentos de descontração, pelas conversas, pelos lanches, cafés e caronas e, principalmente, pela amizade de vocês. Vocês moram em meu coração!

Às técnicas do laboratório: Carol, Lene, Vitória e Luana pela boa vontade em ajudar sempre.

A todos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu **MUITO OBRIGADA!**

**“Nos campos da observação, o acaso favorece  
apenas as mentes preparadas”.**

**(Louis Pasteur)**

## RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram isolar, quantificar, identificar e avaliar a capacidade celulolítica dos fungos filamentosos celulolíticos isolados de sedimento arenoso sob formação arbustiva fechada na restinga de Guaibim, no município de Valença-BA. Foram realizadas quatro coletas mensais de sedimento, destas coletas foram obtidas duas amostras, de pontos diferentes. Para o isolamento foi adotada a Técnica das Diluições Seriadas e o inóculo das diluições foi transferido para placas com meio seletivo de sais minerais com 1% (p/v) de celulose microcristalina. As placas foram incubadas a 28°C por 10 dias. Para identificação morfológica em nível de gênero foi realizada a técnica de microcultivo. Os isolados foram testados quanto ao potencial celulolítico em fermentação submersa contendo papel filtro como única fonte de carbono e meio de sais minerais, para posterior detecção de atividade de Celulase Total (FPase) e Endoglucanase (CMCase), por meio da quantificação de açúcares redutores. O isolado promissor foi testado quanto à produção de celulases utilizando bagaço de cana *in natura* como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio, de acordo com a matriz do planejamento fatorial DCCR 2<sup>3</sup>. A produção da enzima foi otimizada e validada de acordo com as análises fornecidas pelo programa STATSOFT 7.0® e o extrato enzimático foi caracterizado quanto ao ótimo de temperatura e pH. Foram isolados 50 fungos filamentosos celulolíticos da formação arbustiva fechada da restinga de Guaibim. A maioria dos fungos identificados pertence ao filo Ascomycota, sendo os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma* os mais frequentes. Cerca de 44% dos isolados testados apresentaram atividade enzimática de FPase maior que 100 U.L<sup>-1</sup> e 32% apresentaram atividade de CMCase maior que 500 U.L<sup>-1</sup>. O isolado mais promissor foi o *Aspergillus* sp. IS-17 que produziu 880 U.L<sup>-1</sup> de atividade de FPase e 5016 U.L<sup>-1</sup> de atividade de CMCase em fermentação submersa contendo papel filtro como única fonte de carbono, sendo, por isso, selecionado para fermentação utilizando bagaço de cana *in natura*. O isolado testado produziu bons níveis de atividade enzimática, atingindo 3518 U.L<sup>-1</sup> após três dias de fermentação sob condições otimizadas de produção enzimática. A caracterização bioquímica revelou que a enzima endoglucanase produzida por *Aspergillus* sp. IS-17 possui ótimo de atividade à 70°C, pH 6,0 utilizando como tampão citrato de sódio. Os fungos isolados da restinga de Guaibim apresentaram elevado potencial biotecnológico e poderão ser utilizados em diferentes processos industriais, porém, novos estudos deverão ser conduzidos no intuito de detalhar a ação da enzima, verificar a viabilidade econômica e a composição do resíduo utilizado.

Palavras-chave: *Aspergillus*, Bagaço de cana, Celulase, Guaibim, Sedimento arenoso.

## ABSTRACT

The objectives of this study were to isolate, quantify, identify and assess the cellulolytic ability of cellulolytic fungi of sandy sediment in the thicket of Guaibim sandbank in the town of Valença, Bahia. Were collected monthly sediment, in a total of four collections, these collections were obtained two samples of different points. To isolate was taken to the serial dilution technique and the inoculum was transferred to dilution plates with selective medium mineral salts 1% (w/v) microcrystalline cellulose. The plates were incubated at 28°C for 10 days. For morphological identification at genus level was performed microculture technique. The isolates were tested for potential cellulolytic submerged in filter paper containing as the sole carbon source and mineral salts medium for subsequent detection of whole cellulase activity (FPase) and Endoglucanase (CMCase), by quantification of reducing sugars. The isolated promising was tested for production of cellulase using sugar cane bagasse *in natura* as the carbon source and corn steep as nitrogen source such, according to the factorial design CCRD 2<sup>3</sup> array. The enzyme production was optimized and validated according to the analyzes provided by the program STATSOFT ® 7.0 and the enzyme extract was characterized as the optimal temperature and pH. 50 cellulolytic fungi were isolated from the thicket of Guaibim sandbank. Most identified fungi belong to the phylum Ascomycota, and the genus *Penicillium*, *Aspergillus* and *Trichoderma*, more frequent. About 44% of the isolates tested showed enzyme activity FPase greater than 100 U.L<sup>-1</sup> and 32% showed CMCase activity greater than 500 U.L<sup>-1</sup>. The most promising isolate was *Aspergillus* sp. IS-17 which produced 880 U.L<sup>-1</sup> FPase activity and 5016 U.L<sup>-1</sup> CMCase activity in submerged fermentation containing filter paper as the sole carbon source, and therefore selected for fermentation using sugar cane bagasse *in natura*. The isolate tested produced satisfactory levels of enzymatic activity, reaching 3518 U.L<sup>-1</sup> after three days of fermentation under optimized conditions of enzyme production. Biochemical characterization revealed that the endoglucanase enzyme produced by *Aspergillus* sp. IS-17 has optimum activity at 70 ° C, pH 6.0 using sodium citrate as buffer. The isolates of the thicket of Guaibim showed a high biotechnological potential and may be used in various industrial processes, however, new studies should be conducted in order to detail the action of the enzyme, determine the economic viability and composition of waste used.

Keywords: *Aspergillus*, Sugar cane bagasse, Cellulase, Guaibim, Sandy sediment.



## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Restinga de Guaibim, evidenciando as diferentes composições vegetacionais.....	15
<b>FIGURA 2:</b> Estrutura proposta para lignina de madeira de <i>Eucalyptus grandis</i> ..	28
<b>FIGURA 3:</b> Estrutura básica dos principais componentes presentes na hemicelulose.....	29
<b>FIGURA 4:</b> Desenho esquemático da organização estrutural da fibra de celulose.....	30
<b>FIGURA 5:</b> Modo de ação das principais enzimas celulolíticas.....	33
<b>FIGURA 6:</b> Localização da APA de Guaibim (linha pontilhada), município de Valença – Bahia.....	39
<b>FIGURA 7:</b> Unidades formadoras de colônia (UFC.g <sup>-1</sup> de solo) para os diferentes pontos de amostragem.....	46
<b>FIGURA 8:</b> Isolados que apresentaram atividade de FPase maior que 100 U.L <sup>-1</sup> em diferentes tempos de fermentação.....	49
<b>FIGURA 9:</b> Isolados que apresentaram atividade de CMCase maior que 500 U.L <sup>-1</sup> em diferentes tempos de fermentação.....	51
<b>FIGURA 10:</b> Curva de contorno e Superfície de Resposta para atividade de CMCase em função da concentração de fonte de carbono e volume do inoculo (A); em função da concentração de fonte de carbono e nitrogênio (B) e em função da concentração de fonte de nitrogênio e volume do inoculo (C).....	54
<b>FIGURA 11:</b> Curva de contorno e Superfície de resposta para a atividade CMCase em função da milhocina e da concentração de inoculo.....	57
<b>FIGURA 12:</b> Efeito da temperatura na atividade CMCase produzida por <i>Aspergillus</i> sp. IS-17, expressa em atividade relativa.....	58
<b>FIGURA 13:</b> Efeito do pH na atividade CMCase produzida por <i>Aspergillus</i> sp. IS-17, expressa em atividade relativa.....	59

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - Composição química (porcentagem do teor de celulose, hemicelulose, lignina e outros componentes) de alguns resíduos lignocelulósicos.	27
<b>TABELA 2</b> – Produção nacional de cana-de-açúcar e bagaço, expressa em milhões de toneladas, para as safras de 2006 a 2013.....	31
<b>TABELA 3</b> – Localização dos pontos de coleta na restinga de Guaibim, município de Valença-BA.....	40
<b>TABELA 4</b> – Relação dos valores reais dos níveis da composição da matriz do planejamento fracionado.....	43
<b>TABELA 5</b> – Planejamento do tipo DCCR 2 <sup>3</sup> para produção de celulases.....	43
<b>TABELA 6</b> - Relação dos valores reais dos níveis da composição da matriz do planejamento fracionado.....	44
<b>TABELA 7</b> - Planejamento do tipo DCCR 2 <sup>2</sup> para otimização da produção de celulases.....	44
<b>TABELA 8</b> – Identificação dos isolados da formação arbustiva fechada da Restinga de Guaibim – BA.....	47
<b>TABELA 9</b> - Matriz do delineamento composto central rotacional (valores reais), com resultados observados e preditos para produção de CMCase e FPase por <i>Aspergillus</i> sp. IS-17.....	52
<b>TABELA 10</b> - Estimativa dos efeitos para a Atividade CMCase de <i>Aspergillus</i> sp. IS-17.....	53
<b>TABELA 11</b> - ANOVA para os resultados do planejamento DCCR 2 <sup>3</sup> , referente à atividade de CMCase no terceiro dia de fermentação, utilizando bagaço de cana e Milhocina.....	53
<b>TABELA 12</b> - ANOVA para os resultados do planejamento DCCR 2 <sup>3</sup> , referente a atividade de FPase no terceiro dia de fermentação, utilizando bagaço de cana e milhocina.....	54
<b>TABELA 13</b> - Matriz do delineamento composto central rotacional (valores reais), com resultados observados e preditos da otimização para produção de CMCase por <i>Aspergillus</i> sp. IS-17.....	55
<b>TABELA 14</b> - Estimativa dos efeitos para a Atividade CMCase de <i>Aspergillus</i> sp. IS-17.....	56
<b>TABELA 15</b> - ANOVA para os resultados da otimização da atividade CMCase no terceiro dia de fermentação, utilizando bagaço de cana e milhocina.....	56
<b>TABELA 16</b> - Resultados da validação da atividade de CMCase, obtida por <i>Aspergillus</i> sp. IS-17.....	57

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	12
<b>2. Justificativa.....</b>	13
<b>3. Revisão de Literatura.....</b>	14
3.1. Restinga.....	14
3.2. Fungos Filamentosos.....	20
3.2.1. Fungos Filamentosos Celulolíticos.....	23
3.2.2. Gênero <i>Aspergillus</i> .....	25
3.5. Resíduos Lignoceulósicos.....	26
3.5.1. Bagaço de cana-de-açúcar.....	31
3.7. Celulases.....	32
3.8. Aplicações Industriais.....	34
<b>4. Objetivos.....</b>	38
4.1. Objetivo Geral.....	38
4.2. Objetivos Específicos.....	38
<b>5. Metodologia.....</b>	39
5.1. Área de Estudo.....	39
5.2. Coleta do Solo.....	40
5.3. Isolamento e Identificação dos Fungos Celulolíticos.....	40
5.4. Verificação do Potencial Celulolítico dos Isolados.....	41
5.4.1. Determinação da Atividade de Celulase Total – Fpase.....	41
5.4.2. Determinação da Atividade de Endoglucanase – CMCcase.....	42
5.5. Suspensão de esporos dos fungos filamentosos celulolíticos.....	42
5.6. Produção de Celulases Utilizando Bagaço de Cana e milhocina.....	42
5.7. Otimização e validação.....	44
5.8. Determinação do Perfil Ótimo de Temperatura.....	45
5.9. Determinação do Perfil Ótimo de pH.....	45
<b>6. Resultados e Discussão.....</b>	46
6.1. Isolamento e identificação dos Fungos Celulolíticos.....	46
6.2. Verificação do Potencial Celulolítico dos Isolados.....	49
6.2.1. Determinação da Atividade de Celulase Total – Fpase.....	49
6.2.2. Determinação da Atividade de Endoglucanase – CMCcase.....	50

6.3. Produção de Celulases Utilizando Bagaço de Cana e milhocina.....	51
6.4. Otimização e Validação.....	55
6.5. Determinação do Perfil Ótimo de Temperatura.....	58
6.6. Determinação do Perfil Ótimo de pH.....	59
<b>7. Conclusões.....</b>	<b>60</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>62</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os principais componentes da biomassa são polímeros constituídos de glicose e outros açúcares relacionados, estes se tornarão as principais fontes de carbono e energia para processos de fermentação microbiana, após serem convertidos a monossacarídeos. Grande parte dessa biomassa é originária de tecido vegetal rígido, consistindo principalmente de celulose, hemicelulose, lignina e proteínas (XIMENES e FÉLIX, 2002).

A celulose, recurso natural renovável mais abundante do planeta (BAYER e LAMED, 1992) e principal constituinte da parede celular de plantas superiores (MARTINS, 2005), é composta por unidades de D-Glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta \rightarrow 1-4$ . A celulose pode ser eficientemente degradada a glicose, celobiose e oligossacarídeos por celulasas (DILLON, 2004). As celulasas constituem-se em um complexo de enzimas de ampla aplicação industrial, sobretudo na indústria têxtil, onde é empregada no descolorimento e amaciamento de tecidos (KUBICEK et al., 1993); na indústria alimentícia na extração de componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes e do amido da batata doce (ORBERG, 1981); na indústria de papel e celulose, na sacarificação de biomassa e biobranqueamento de polpas de papel (FILHO, 1998; SILVEIRA et al., 1999) e na indústria de biocombustíveis, para produção de bioetanol de segunda geração.

Na natureza, existe uma grande variedade de micro-organismos que produzem celulasas, porém, apenas alguns são capazes de degradar a celulose natural (ROBSON e CHAMBLISS, 1989). Entre estes estão os fungos filamentosos que constituem um dos grupos de micro-organismos mais importantes na atividade de decomposição da matéria orgânica em função de sua capacidade especializada de degradação (VELÁZQUEZ-CEDEÑO, MATA e SAVOIE, 2002), sobretudo da celulose. Em geral, os fungos que decompõem celulose ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos (LYNCH et al., 1981).

A eficiente utilização da celulose por fungos requer ação sinérgica de várias enzimas hidrolíticas (CAI et al., 1998, 1999; DING, GE e BUSWELL, 2001), constituindo um complexo enzimático altamente específico. Esse complexo enzimático é composto por um conjunto de três enzimas hidrolíticas: as endo- $\beta$ -1,4-glucanases (EG I, EG II, EG III, EG IV, e EG V; EC 3.2.1.4), que hidrolisam as ligações glicosídicas ao acaso na fibra de celulose; as exo- $\beta$ -1,4-glucanases ou celobiohidrolases (CBH I e CBH II; EC 3.2.1.91), que agem nas extremidades redutoras e não redutoras de polímeros gerados pela ação das endoglucanases,

liberando celobiose; e as  $\beta$ -1,4-glicosidases (BG I, BG II; EC 3.2.1.21) que hidrolisam oligossacarídeos e celobiose à glicose (BISARIA e GHOSE, 1981; ZEILINGER et al., 2000). Muitos micro-organismos têm sido amplamente estudados por apresentam tais sistemas enzimáticos, especialmente espécies dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicilium*.

Embora as enzimas hidrolíticas produzidas por espécies de fungos filamentosos possuam ampla aplicabilidade industrial e importante papel ecológico, poucos trabalhos vêm sendo desenvolvidos relacionando a importância ecológica dos fungos e seu potencial enzimático.

## 2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, tem crescido muito o interesse em estudos de bioprospecção microbiana no Brasil, sobretudo pela promessa da produção de combustíveis a partir de resíduos agroindustriais e por seu amplo potencial em explorar a diversidade microbiana. Uma parte da biodiversidade microbiana do Brasil é conhecida e explorada de diversas formas. No entanto, pouco se conhece a respeito da microbiota brasileira, pois, muitos ecossistemas existentes no Brasil, como as restingas, ainda não foram estudados. É necessário realizar um levantamento mais detalhado da biodiversidade microbiana e avaliar o potencial na produção de enzimas em qualquer setor onde elas possam ser utilizadas.

Neste contexto, é evidente o papel das pesquisas em explorar os diferentes ecossistemas, principalmente o da restinga, que têm sofrido crescentes impactos ambientais em favor do empreendedorismo e da ausência de conhecimento acerca da sua importância sob o ponto de vista ecológico.

Realizar estudos de bioprospecção se torna importante porque além de evidenciar as atividades metabólicas dos micro-organismos, em especial dos fungos, que vivem neste ambiente, atores fundamentais na ciclagem de diversos nutrientes na natureza, e de avaliar o potencial de produção de enzimas de importância industrial, como as celulases, poderá inferir-se a respeito das relações ecológicas entre os micro-organismos sobre o solo da restinga.

O presente trabalho busca conhecer a comunidade de fungos filamentosos celulolíticos que habita o solo da restinga de Guaibim, realizar estudos de bioprospecção, com foco na sua capacidade de produzir celulases, utilizando resíduos agroindustriais como o bagaço de cana *in natura*.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 RESTINGA

As restingas são ambientes geologicamente recentes, edificadas diretamente ou a partir do acúmulo de sedimentos marinhos retrabalhados através de sucessivas flutuações do nível do mar, no início do Quaternário. Essas flutuações deram origem aos cordões arenosos litorâneos que foram recobertos por vegetação, denominada de vegetação de restinga e são responsáveis pela configuração e distribuição da maior parte deste tipo de ecossistema na costa atual (HALLEGOUET, 1984; LACERDA, ARAÚJO E MACIEL, 1982; SOUZA, 1945).

Embora as restingas ocupem cerca de 79% da costa brasileira (LACERDA, ARAÚJO E MACIEL, 1993), abrangendo um total de 7.400 Km de extensão (IBGE, 2004) ainda não há um consenso no meio científico quanto à definição do termo “restinga”. O termo era empregado para designar vários tipos de depósitos litorâneos, outras feições costeiras e comunidades vegetacionais (SUGUIO e TESSLER, 1984). Araújo e Henriques (1984) e Cerqueira (2000) definiram restinga como o conjunto das comunidades vegetais fisionomicamente distintas, sob influência marinha e flúvio-marinha, ocorrendo sobre os depósitos arenosos costeiros. Essas comunidades vegetais sofrem influência direta do solo, do clima, de fatores físico-químicos e de fatores temporais de caráter sucessional (ARAÚJO, 1987). Posteriormente, Suguio (1992) definiu o termo restinga sob o ponto de vista geológico, como uma barreira arenosa de origem marinha, recente, que aprisiona corpos aquosos costeiros. Rizzini (1997) define as restingas como formações vegetais heterogêneas, compostas por comunidades distribuídas em mosaico que advém de biomas do entorno. Sugiyama (1998) definiu restinga em sentido botânico, como sendo “o conjunto de comunidades vegetais fisionomicamente distintas, sob influência marinha e flúviomarinha, distribuídas em mosaico e que ocorrem em áreas com grande diversidade ecológica”. Em 1999, a Resolução 261 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA passou a definir restinga como:

“[...] um conjunto de ecossistemas que compreende comunidades vegetais florística e fisionomicamente distintas, situadas em terrenos predominantemente arenosos, de origem marinha, fluvial, lagunar, eólica ou combinações destas, de idade quaternária, em geral com solos pouco desenvolvidos”,

sintetizando os diversos conceitos em apenas um (BRASIL, 1999). Nesse mesmo período, o termo restinga estava sendo cada vez mais utilizado no sentido de ecossistema, considerando não só as comunidades de plantas, mas também as de animais e o ambiente físico em que vivem (FALKENBERG, 1999). Na fitogeografia, o termo restinga foi empregado para definir formações que cobrem as areias holocênicas desde o oceano, ou apenas a vegetação lenhosa, arbustiva ou arbórea, mais interna (SOUZA, 2004).

Com relação à vegetação da restinga (Figura 1), na linha da praia estabelece-se uma vegetação adaptada a condições salinas e arenosas, que se denomina vegetação halófila-psamófila (IBGE, 2004). Numa região mais intermediária encontra-se uma vegetação arbustivo-arbórea, geralmente em moitas densas, que se diferenciam das comunidades florestais em função das condições microclimáticas (maior salinidade e ventos mais fortes na área de moitas) e da composição florística (CESÁRIO e GAGLIANONE, 2008). E mais para o interior estão as comunidades florestais, que podem ou não sofrer inundações durante o ano (ARAÚJO e HENRIQUES, 1984; SILVA, 1998) e apresentam fisionomia, estrutura e composição florística diferenciadas e recebem variadas denominações como mata seca, mata de Myrtaceae (ARAÚJO e HENRIQUES, 1984; BASTOS, 1996; PEREIRA, 1990), mata arenosa (WAECHTER, 1985), floresta arenícola costeira (TRINDADE, 1991), floresta arenosa litorânea (FABRIS 1995) ou simplesmente mata ou floresta de restinga (CÉSAR e MONTEIRO, 1995; LOBÃO e KURTZ, 2000; SILVA et al., 1994; SUGYIAMA e MANTOVANI, 1994). Esta diversidade fisionômica expressa uma composição que geralmente mescla espécies próprias do litoral com outras provenientes de ecossistemas como floresta atlântica, cerrado e tabuleiros arenosos (FREIRE, 1990; SCARANO, 2002).



**Figura 1:** Restinga de Guaibim, evidenciando as diferentes composições vegetacionais.



Para Falkenberg (1999), três fisionomias distintas se destacam na vegetação da restinga: praias e dunas frontais, constituídas por plantas herbáceas com estolões ou rizomas e com populações esparsas ou em touceiras, recebendo influência direta do mar; dunas internas e planícies, que se situam após as dunas frontais, estando mais distante do mar, recebendo menor influência do mesmo, sendo caracterizadas pela presença de dunas móveis ou semifixas e; lagunas, banhados e baixadas, as quais são caracterizadas por depressões com ou sem inundações, podendo haver ou não influência do mar. A intensidade e a duração dos ventos são os fatores principais na formação, manutenção e regime da mobilidade das dunas (AVELAR et al., 1995). As espécies encontradas no ambiente de restinga apresentam capacidade de suportar os fatores físicos dominantes como: salinidade, extremos de temperatura, forte presença de ventos, baixa disponibilidade de água, solo instável e insolação forte e direta (SOUZA, 2004; ROCHA, ESTEVES E SCARANO, 2004; WAECHTER, 1985). Atualmente o CONAMA, através da resolução nº 224, de 24 de novembro de 2009, define vegetação de restinga como:

“conjunto de comunidades vegetais, distribuídas em mosaico, associado aos depósitos arenosos costeiros quaternários e aos ambientes rochosos litorâneos – também consideradas comunidades edáficas - por dependerem mais da natureza do solo do que do clima, encontradas nos ambientes de praias, cordões arenosos, dunas, depressões e transições para ambientes adjacentes, podendo apresentar, de acordo com a fitofisionomia predominante, estrato herbáceo, arbustivo e arbóreo, este último mais interiorizado” (BRASIL, 2009).

A classificação dos tipos vegetacionais que seja adequada para toda a costa brasileira é dificultada devido à ausência de dados ecológicos e fisionômicos de diversos trechos do litoral brasileiro e à falta de consenso sobre o que constitui a vegetação sobre as planícies costeiras arenosas (ARAÚJO, 1992). Araújo et al. (1988) descreveram sucintamente 10 comunidades vegetais ou formações de restinga para o litoral norte fluminense: halófila-psamófila reptante, herbácea brejosa, arbustiva fechada de pós-praia, arbustiva aberta de *Clusia*, arbustiva aberta de *Ericaceae*, arbustiva aberta de *Palmae*, mata periodicamente inundada, mata permanentemente inundada, mata de cordão arenoso e vegetação aquática. Para Veloso (1992), as diversas fisionomias de restinga estão englobadas na unidade “Formações Pioneiras com Influência Marinha”. No entanto, devido às inúmeras diferenças existentes quanto ao conjunto florístico e ao arranjo estrutural das populações nas distintas áreas de restinga ao longo da costa brasileira, esta classificação não vem sendo utilizada (ARAÚJO e HENRIQUES, 1984; MENEZES e ARAÚJO, 1999; SÁ, 1992). A resolução CONAMA nº 424, de 23 de novembro de 2009 classifica os tipos vegetacionais de restinga em: vegetação herbácea e subarbustiva de restinga, vegetação arbustiva de restinga, vegetação

arbórea de restinga e transição floresta de restinga-floresta ombrófila densa (BRASIL, 2009). Essa classificação serve de embasamento legal para fins de controle ambiental e avaliação de impactos ao meio ambiente. Com relação ao Nordeste, com base em estudos de florística, Andrade-Lima (1960) distinguiu a vegetação da restinga como um tipo de vegetação da zona do litoral, podendo ser subdividida em mata de restinga e campo de restinga. Porém, ao se considerar estudos de florística e de fitossociologia realizados nesse ecossistema a partir do ano 2000 (MEDEIROS, LOPES e ZICKEL, 2007; SACRAMENTO, ZICKEL e ALMEIDA JR., 2007; SILVA et al., 2008; ZICKEL et al., 2007; ZICKEL et al., 2004) observa-se que as terminologias propostas por Silva e Brites (2007), campo, fruticeto e floresta, são mais adequadas e flexíveis para classificar as restingas até o momento estudadas no Nordeste, devido à baixa ocorrência de Clusiaceae e de Myrtaceae. Além disso, a proposta de Silva e Brites (2005) também considera a influência da variação do lençol freático e do nível de sobreposição de copas na estrutura da vegetação, que não foram contempladas na classificação de Andrade-Lima (1960).

Os solos sob a vegetação de restinga são arenosos e pobres em nutrientes, cuja principal fonte de nutrientes é o *spray* marinho (ARAÚJO e LACERDA, 1987; LEÃO e DOMINGUEZ, 2000). A natureza do solo de restinga torna esse hábitat extremamente frágil (HAY et al., 1981). Segundo Albertoni e Esteves (1999), a fragilidade desse tipo de ecossistema é confirmada pela espessura do solo de cinco a dez centímetros. A retirada da vegetação em estágios mais avançados de degradação acarreta a intensa erosão do solo pela ação do vento (ARAÚJO e LACERDA, 1987). Aliado a esse fator, a recomposição é lenta após desmatamento em decorrência da ausência de um banco de sementes favorável (HAY, HENRIQUES e LIMA, 1981). Tais características são responsáveis pela elevada vulnerabilidade das restingas a impactos antrópicos. Estudos indicam que, na costa brasileira, sob essa vegetação, as principais classes de solos encontradas são Espodosolos e Neossolos Quartzarênicos (GOMES et al., 1998; MOURA FILHO, 1998; ROSSI, 1999).

Do ponto de vista da biodiversidade, pode-se considerar que a zona costeira acolhe quadros naturais, particulares de alta riqueza e relevância ecológica, que os qualifica como importantes fontes de recursos para o ambiente (IBGE, 1996). Em um estudo realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2004), apenas nas restingas localizadas entre Rio Real e Salvador (260 Km de extensão) foram encontradas 520 espécies de plantas. Segundo Rocha, Esteves e Scarano (2004), as restingas suportam uma fauna diversa e ainda pouco conhecida. Há registros de diversos invertebrados, como insetos (LIMA, SOARES e

SINZATO, 2007) e aranhas (RODRIGUES, 2005) e de vertebrados como roedores e marsupiais (LESSA et al., 2007), lagartos (FREIRE, 1996) e aves (MALLET-RODRIGUES et al., 2008) entre outras espécies.

Devido à relevante importância do ecossistema de restinga, tanto pela sua biodiversidade quanto por pertencer ao Bioma Mata Atlântica, diversos instrumentos legais foram estabelecidos com o intuito de proteger e preservar as restingas brasileiras. O artigo 2º, do Código Florestal de 1965, define as restingas como áreas de preservação permanente: “consideram-se de preservação permanente, pelo só efeito desta Lei, as florestas e demais formas de vegetação natural situadas nas restingas, como fixadoras de dunas ou estabilizadoras de mangues”. A Resolução CONAMA 303/2002 define a faixa de 300 metros da preamar máxima, como Área de Preservação Permanente nas restingas (BRASIL, 2002).

A ocupação do território brasileiro iniciou-se nas regiões costeiras desde a Pré-História. Porém, a exploração destas regiões só foi intensificada a partir do século XV quando ocorreu a colonização europeia, aumentando exponencialmente a ocupação e, conseqüentemente, o impacto sobre as áreas de restinga (SAMPAIO, 2005). Tais impactos podem ter levado diversas comunidades vegetais a se extinguir em diversos trechos da costa (ARAUJO e HENRIQUES, 1984). Lacerda e Esteves (2000) consideram que as restingas, devido ao longo tempo de ocupação, encontram-se, de alguma maneira, alteradas pela ação antrópica e total ou parcialmente degradadas, apesar dos instrumentos legais de proteção desses ambientes. Assim, junto com a degradação do ambiente, muitas espécies vegetais são eliminadas antes mesmo de serem estudadas quanto às características ecológicas, potenciais terapêutico, ornamental, alimentar ou quaisquer benefícios que possam vir a trazer à comunidade (ALBERTASSE, THOMAZ e ANDRADE, 2010). Na restinga de Guaibim, local de estudo deste trabalho, a ameaça está relacionada principalmente à exploração imobiliária para veraneios, à retirada de areia, introdução de espécies exóticas e à poluição pelo acúmulo de lixo e esgoto.

No Brasil, há diversos estudos relacionados à vegetação de restinga, com predominância dos estudos realizados na região Sul e Sudeste, sobretudo em Santa Catarina, Rio de Janeiro, São Paulo e Espírito Santo. Os trabalhos da região Sul e Sudeste abordam desde a caracterização florística de comunidades vegetais de restinga (MARTINS et al., 2008), passando por estudos de fitossociologia (DANIEL, 2006), até estudo de plantas medicinais (ALBERTASSE et al., 2010) e estudos polínicos (GONÇALVES-ESTEVEES e MENDONÇA, 2001). Na região Nordeste, destacam-se os estudos de Almeida Jr. et al.

(2009) que caracterizou a vegetação da restinga de Maracaípe no estado de Pernambuco e Sacramento et al. (2007) que listou a flora e caracterizou a fisionomia da restinga da praia do Paiva, também em Pernambuco. Na Bahia estudos sobre a composição florística da restinga ainda são escassos, podendo ser citados os trabalhos de Queiroz (2007) que realizou um levantamento florístico de espécies com potencial econômico e ecológico em restinga de Mata de São João e Da Silva e Menezes (2007) que realizou o manejo de espécies vegetais em uma mata de restinga no litoral norte da Bahia.

Trabalhos sobre a fauna de restingas são descritos com menor frequência na literatura que os trabalhos sobre a vegetação, no entanto, semelhante aos estudos florísticos, a maior concentração desses estudos está nas regiões Sul e Sudeste. Cita-se o trabalho de Silveira (2009) sobre a diversidade de besouros da restinga da Praia do Pântano do Sul, Florianópolis, o de Lima, Soares e Sinzato (2007) que analisou a biodiversidade entomológica da restinga do Parque Natural Municipal de Marapendi no Rio de Janeiro. Na Bahia, pode ser citado o trabalho de Melo (1996) que realizou um levantamento de espécies de *Coccoloba* do litoral norte, sul e recôncavo da Bahia; Gimenez e Lobão (2006) verificaram a Polinização de *Krameria bahiana* B.B. Simpson por abelhas na Restinga de Arembepe; Vianna, Silva e Kleinert (2006) estudaram a flora apícola de dunas litorâneas do Abaeté, em Salvador e Martins, Dias e Rocha (2010) estudaram a ecologia e conservação do lagarto *Tropidurus hygomi* nas restingas do litoral norte.

Com relação a estudos sobre micro-organismos isolados de restinga não há muitas referencias na literatura, especialmente sobre fungos filamentosos celulolíticos. Os trabalhos geralmente são limitados a fungos que formam micorrizas ou leveduras, indicando uma lacuna no que diz respeito ao conhecimento da comunidade de fungos filamentosos celulolíticos presentes no solo das restingas brasileiras, e seu potencial biotecnológico (CORDEIRO et al., 2003; CORDAZZO e STÜRMER, 2007; HAGLER et al., 1993; MORAIS et al., 1994; ROSA et al., 1995; SANTOS, OLIVEIRA e NOVAIS., 1995; STÜMER e BELLI, 1994; TAVARES, 1998). Estudar a atividade microbiana no solo de restinga pode ajudar na preservação desse ecossistema, já que essa diversidade reflete influências de todos os fatores que regulam a degradação da matéria orgânica, a transformação e reciclagem dos nutrientes, através dos ciclos biogeoquímicos (TÓTOLA, 2002).

### 3.2 FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos são seres eucarióticos que apresentam uma grande versatilidade metabólica o que permite seu crescimento em diversas condições ambientais, sendo encontrados na água, no ar atmosférico, no solo, sobre os animais e vegetais vivos, na matéria orgânica em decomposição, nos produtos alimentícios e produtos industriais (OLIVEIRA et al., 2008).

Durante muito tempo os fungos foram incluídos no Reino *Plantae* e, somente a partir de 1969, devido às suas características peculiares, estes foram classificados em um Reino exclusivo, denominado *Fungi* por Whittaker. Os fungos apresentam um conjunto de características próprias que permitem sua diferenciação das plantas, tais como: não sintetizam clorofila, não tem celulose na sua parede celular, exceto alguns fungos aquáticos e não armazenam amido como substância de reserva. Na verdade os fungos estão mais próximos ao Reino *Animalia* devido à presença de substâncias quitinosas na parede da maior parte das espécies fúngicas, presença de flagelo posterior, o fato de seu código mitocondrial UGA codificar triptofano e à sua capacidade de depositar glicogênio. O Reino *Fungi* baseado em suas estruturas esporuladoras de origem sexual é dividido em quatro filos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota (LOGUERCIO-LEITE, 2010).

O filo Chytridiomycota inclui apenas a classe *Chytridiomycetes*, que é composta por fungos simples e com dimensões bastante pequenas. Neste filo encontram-se, ainda, fungos que possuem esporos flagelados. São sapróbios, estando envolvidos na decomposição de vários substratos orgânicos, como quitina, queratina e celulose. São encontrados ocorrendo nos corpos de água, no solo, alguns em ambiente marinho e, inclusive, no deserto (HAWKSWORTH et al., 1995; LOGUERCIO-LEITE, 2010). Algumas espécies vivem em associação com herbívoros e outras são patógenos de plantas, animais e de outros fungos (ALEXOPOULOS, MIMS e BLACKWELL, 1996; CARLILE e WATKINSON, 1994). A reprodução assexuada, na maioria dos casos, ocorre através da liberação de zoósporos uniflagelados, originados nos zoosporângios, enquanto a sexuada ocorre através de plasmogamia (HAWKSWORTH et al., 1995).

*Zygomycetes* e *Trichomycetes* são as duas classes do filo Zygomycota. A primeira é marcada pela produção de esporos de resistência, denominado zigósporo e a segunda por possuir membros que vivem associados a artrópodos vivos. Possuem espécies saprótrofas, ocorrendo em esterco, no solo, serapilheira e outros restos orgânicos; espécies parasitas de

plantas cultivadas, de humanos e de algas; espécies predadoras de pequenos animais e simbioses, formadores de endomicorrizas e ectomicorrizas. Industrialmente são produtoras de amilases, de ácidos orgânicos, fumárico, succínico e oxálico, de cortisona e de alimentos populares na Ásia, como *sufu* e *tempeh*. Outra característica marcante do grupo é a capacidade de dimorfismo. A reprodução assexuada ocorre por diferenciação de hifas especializadas em esporangióforos que dão origem a esporângios e a sexual ocorre pela fusão de gametângios, que irão sofrer plasmogamia, cariogamia e meiose até formar o zigospórangio, onde são produzidos os zigósporos (LOGUERCIO-LEITE, 2010).

O maior filo do Reino *Fungi* em número de espécies é o filo *Ascomycota*, com 32.000 espécies. Entre seus membros estão fungos saprófitos, coprófilos, cortícolas, lignícolas, folículas e simbioses, formando líquens e micorrizas. Alguns mitosporicos, fungos que só produzem fases anamórficas, são parasitas e endossimbiontes de artrópodes. Os gêneros *Trichoderma* e *Penicillium* tem grande importância industrial devido a sua capacidade de produzir celulases e antibióticos, respectivamente, em elevadas quantidades. A reprodução assexuada pode ocorrer por gemação, fissão, fragmentação ou por formação de clamidósporos ou conídios. A reprodução sexuada ou parte dela ocorre dentro de ascomas, estruturas multi-hifais protetoras, e culmina com a produção de ascósporos (LOGUERCIO-LEITE, 2010).

O filo *Basidiomycota* é distinguido dos demais, principalmente, por sua estrutura reprodutiva, o basídio. Entre as estratégias nutricionais deste grupo estão a saprotrofia, a coprofilia, parasitismo e a formação de micorrizas e líquen. É um grupo muito importante por que, além de sua utilização industrial para produção de antibióticos e de sua comercialização como alimentos, esses fungos são empregados no clareamento de efluentes industriais e na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos. Algumas espécies produzem substâncias alucinógenas e venenosas, como falotoxinas e amatoxinas. Fragmentação do micélio, brotamento e produção de conídios, artrósporos ou oídios são os tipos de reprodução assexuada dos basidimicetos. A reprodução sexual ocorre por plasmogamia, cariogamia e meiose, sendo que a cariogamia e a meiose ocorrem dentro do basídio, estrutura diferenciada nas extremidades das hifas (LOGUERCIO-LEITE, 2010).

Embora os fungos tenham a capacidade de viver nos mais variados habitats da terra, devido à sua diversidade metabólica, o solo é o reservatório mais comum dos fungos filamentosos, onde é encontrada uma ampla diversidade desses micro-organismos, sobretudo nas zonas úmidas. De acordo com Christensen e Tuthill (1985), a diversidade e dominância da população de fungos no solo depende da ocorrência de habitats específicos para determinadas

espécies e a alta diversidade de fungos em um ecossistema. A alta diversidade de fungos de solos, nas zonas úmidas, como as florestas tropicais, deve-se em parte a variabilidade florística e aos demais organismos que compõem estas áreas (BILLS e POLISHOOK, 1994; KUTER, 1986). A diversidade da comunidade fúngica do solo, parece tornar-se reduzida em habitats com baixa diversidade florística, assim como as queimadas e manejo de áreas cultivadas podem afetar a diversidade de fungos do solo (KLICH, 2002). Os fungos do solo, associados ao clima, as raízes e a compressão do solo, têm sido apontados como importantes fatores que influenciam a estabilidade dos agregados do solo em água (LYNCH e BRAGG, 1985). Sendo que as hifas dos fungos são responsáveis pela estabilização dos macroagregados (TISDALL e OADES, 1982). De acordo com Gonzales et al. (2001) os micro-organismos, entre eles os fungos filamentosos, são os principais agentes da atividade bioquímica do solo, estando diretamente envolvidos em todos os processos biológicos e influenciando processos físicos e químicos. Além disso, contribuem para o aumento da fertilidade do solo pela mineralização de nutrientes a partir da matéria orgânica ou pela oxidação de nitrogênio no solo (EMBRAPA, 2002). Dessa forma, os produtos do metabolismo fúngico constituem uma das principais vias de ciclagem de nutrientes, como nitrogênio mineral e fósforo, tornando-os disponíveis para as plantas (NEPSTAD et al., 1999). Esse processo biológico de mineralização, realizado pelos fungos, pode fornecer bases científicas para a compreensão das reações bioquímicas pelas quais os compostos orgânicos são levados a compostos inorgânicos e seus elementos constituintes (ATLAS e BARTHA, 1993; SALAMANCA, RAUBUCH e JOERGENSEN, 2002). A microbiota do solo pode ser usada, ainda, como indicador da qualidade do solo, uma vez que esses micro-organismos são muito sensíveis a fatores bióticos e abióticos (SAUTTER, 1998).

Outra importante contribuição ecológica dos fungos filamentosos é sua ação biodegradadora. Eles encontram as substâncias necessárias para o seu desenvolvimento na natureza, principalmente, macromoléculas insolúveis, que precisam ser primeiramente degradadas em unidades monoméricas solúveis antes de sua assimilação. Polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lignina, lipídios e outros compostos de grande peso molecular, ou insolúveis, não podem ser incorporados diretamente sem antes terem sido hidrolisados. Para isso, esses organismos secretam enzimas extracelulares específicas, conseguindo reduzir o tamanho das moléculas e aumentar a sua solubilidade. Assim, os fungos absorvem nutrientes através da membrana plasmática, como compostos de baixo peso molecular dissolvidos em água (OLIVEIRA et al., 2008). Assim, essas substâncias passam pela membrana, que tem

grande poder seletivo para moléculas pequenas, apesar de algumas enzimas que fazem parte de sua composição poder incorporar, ativamente, determinados nutrientes por seleção. Desse modo, moléculas simples terão preferência na sua utilização como nutrientes, sendo, então, reprimida a síntese de enzimas para moléculas mais complexas. Por exemplo, se houver glicose no meio, a qual é preferida pelo fungo, não serão produzidas as enzimas para degradar substratos complexos, como amido e celulose, nem enzimas para degradar dissacarídeos, como galactose, maltose e sacarose (PUTZKE e PUTZKE, 2002).

Com exceção das espécies que causam doenças, a diversidade de fungos ainda é pouco conhecida. A estimativa do número de espécies microbianas utilizando diferentes métodos levou a um mesmo consenso de que existam cerca de 1,5 milhão de espécies das quais somente 70 mil são conhecidas, ou seja, aproximadamente 5% (HAMMOND, 1992; HAWKSWORTH, 1991, 1993; ROSSMAN, 1994; TRÜPER, 1992). No mundo estão descritas aproximadamente 99.000 espécies de fungos (KIRK et al. 2008), das quais, aproximadamente, 14 % existiriam no Brasil (LEWINSOHN e PRADO, 2006). Contudo, foram registradas apenas 3.608 espécies, correspondendo a apenas 3,7 % das descritas mundialmente. O maior número de espécies registradas pertence ao bioma Mata Atlântica (1.664 espécies), para a Caatinga há registros de 734 espécies, 519 espécies na Amazônia, 291 no Cerrado, 28 no Pantanal e apenas uma nos Pampas (JÚNIOR e MAIA, 2010). A Região Nordeste possui maior registro de diversidade de fungos, com 1.749 espécies descritas, a Sudeste possui 1.411, a Sul possui 1.320, a Norte 743 e Centro-Oeste 296 espécies. A Bahia é o quarto estado com maior número de espécies (584) (JÚNIOR e MAIA, 2010).

### **3.2.1 FUNGOS FILAMENTOSOS CELULOLÍTICOS**

A biodegradação dos materiais lignocelulósicos constitui um dos mais importantes ciclos do carbono na natureza e os fungos filamentosos celulolíticos são atores importantes neste processo. O processo de degradação biológica dos materiais lignocelulósicos por fungos é atribuído à ação de uma série de enzimas e compostos extracelulares, que metabolizam lignina, hemicelulose e celulose a monômeros de glicose. A degradação ocorre necessariamente de forma extracelular, uma vez que os componentes da biomassa vegetal devem ser inicialmente despolimerizados até compostos menores que são susceptíveis ao transporte pela parede celular e ao metabolismo intracelular dos fungos envolvidos. Essa



habilidade dos fungos filamentosos é atribuída à capacidade de penetração de suas hifas no lúmen das células vegetais, que, uma vez aí instaladas produzem diversos metabólitos extracelulares que irão atuar na degradação da parede celular vegetal (FERRAZ, 2010; KIRK e CULLEN, 2010).

A rapidez na qual os materiais lignocelulósicos são decompostos na natureza é bastante variável e depende das condições de umidade e temperatura as quais serão expostos, bem como da biodiversidade fúngica existente no local e do conteúdo de matéria orgânica no solo. Em geral, os fungos que decompõem substâncias celulósicas ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos, com importante função na reciclagem de nutrientes. O conhecimento da microbiota do solo, além de fundamental para o levantamento taxonômico das populações que ali se encontram, pode levar ao descobrimento de processos metabólicos utilizados por estes organismos tornando-se importantes para as interações ambientais e aplicações biotecnológicas (LEVY, 1987; RUEGGER e TAU-K-TORNISIELO, 2002).

Os organismos mais efetivos na biodegradação dos materiais lignocelulósicos na natureza são os fungos de decomposição branca, que degradam todos os componentes da madeira, e os fungos de decomposição parda, que degradam polissacarídeos. A grande maioria desses organismos pertence à classe Basidiomycota, sendo que ascomicetos e fungos mitospóricos também podem degradar lignina e polissacarídeos, porém em velocidades muito baixas (FERRAZ e DURAN, 1995; KIRK e CULLEN, 2010; RODRIGUEZ et al., 1997). Dentre os fungos filamentosos, frequentemente reportados como bons produtores de enzimas que degradam material celulolítico, estão: *Trichoderma* (BOLLÒK e RÈCZEY, 2000; GUTIERREZ-CORREA et al., 1999; MASSADEH et al., 2001), *Aspergillus* (GUTIERREZ-CORREA et al., 1999; TSAO et al., 2000) e *Penicillium* (BOLLÒK e RÈCZEY, 2000; MARTINS, 2005; JØRGENSEN et al., 2005), gêneros mais frequentemente citados na literatura. Outros fungos celulolíticos incluem as espécies *Neurospora crassa*, *Arthrographis cellulolyticum*, *Fusarium solani*, *Mucor circinelloides*, *Sinortizobium fredii* (simbionte) e *Sporotrichium pruinosum* (RABINOVICH, MELNICK e BOLOBOVA, 2002; SAHA, 2004).

Muitos estudos tem sido realizados com a finalidade de encontrar fungos filamentosos com elevada capacidade de degradar substratos celulósicos, enquanto outros estudos tem focado na manipulação genética desses micro-organismos com o objetivo de elevar a produção de metabólitos de interesse industrial (AZEVEDO, 2010). No entanto, um micro-organismo capaz de degradar todos os componentes da biomassa vegetal, por si só, ainda não

foi isolado. Isto ocorre por que, além de não haver um fungo que produza todas as enzimas necessárias para a completa degradação da biomassa vegetal, no substrato encontram-se diversas populações em interações sinérgicas que levam a completa hidrólise da celulose, que é convertida à glicose e esta em dióxido de carbono e água, em condições aeróbicas (BEGUIN e AUBERT, 1994). As principais enzimas responsáveis pela degradação dos componentes lignocelulósicos são as xilanases, celulasas e as lignina-peroxidases (NASCIMENTO et al., 2009).

### 3.2.2 GÊNERO *ASPERGILLUS*

Um dos mais antigos gêneros de fungos, *Aspergillus*, recebeu esse nome do padre italiano e biólogo Pietro Antonio Micheli em 1729. Em visualização da estrutura de esporos microscópicos de rolamento, Micheli lembrou-se de um dispositivo usado pelo Clero católico romano para aspergir água benta durante uma parte da liturgia chamada de asperges (AINSWORTH, 1976). Uma monografia publicada por Raper e Fennell em 1965 descrevia 132 espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Embora esse estudo ainda seja valioso e útil, muitas espécies novas tem sido descritas desde então, chegando a 250 espécies e tendendo a aumentar significativamente (GEISER, 2008).

A diferenciação das espécies de *Aspergillus* é realizada a partir da macro e micromorfologia do fungo. Na avaliação macroscópica, as colônias deste gênero apresentam diferentes colorações do verso e reverso, textura e topografia conforme a espécie. Todas as espécies do gênero *Aspergillus* apresentam microscopicamente hifas regulares medindo aproximadamente 4µm de diâmetro, septadas, com bifurcações em ângulo agudo e estrutura de esporulação caracterizada por conidióforos com extremidade dilatada formando a vesícula, de onde se originam as fiálides que dão origem aos conídios (LACAZ, PORTO e MARTINS, 1984; MARTINS, et al., 2005; RAPER e FENNELL, 1965; SANTOS, 1999; SIDRIM e ROCHA, 2004).

Esporos de *Aspergillus* são componentes comuns de aerossóis onde se misturam às correntes de ar, dispersando-se em curtas e longas distâncias dependendo das condições ambientais. Quando os esporos entram em contato com a superfície de um sólido ou líquido, são depositados e, se as condições de umidade forem favoráveis, eles germinam (BENNET, 2010). Eles são mais frequentemente encontrados em habitats terrestres e são comumente

isolados do solo e de plantas, muitos destes crescem abundantemente como saprófitas em vegetais em decomposição. A maioria das espécies é adaptada para a degradação de polímeros vegetais complexos, mas podem também retirar energia para seu metabolismo de diversos substratos como esterco, tecidos humanos e pergaminho antigo (POLACHECK et al., 1989). Há até mesmo um relatório de uma espécie não identificada de *Aspergillus* que é capaz de solubilizar carvão de baixo escalão (TORZILLI e ISBISTER, 1994). O processo de decomposição realizado por este grupo é importante na condução natural de ciclagem de elementos químicos, particularmente no ciclo do carbono, onde contribuem para a reposição do fornecimento de dióxido de carbono e outros compostos inorgânicos (CARROLL e WICKLOW, 1992).

A grande importância econômica do gênero *Aspergillus* ocorre devido a sua capacidade de produzir enzimas que são utilizadas nos mais variados setores da indústria, tais como: indústria alimentícia, farmacêutica e de biocombustíveis. Diversos autores têm mencionado, ainda, o uso de espécies de *Aspergillus* visando a remoção de fenol em efluentes industriais (GARCÍA, et al., 2000; SANTOS e LINARDI, 2004) e para obtenção de bioprodutos por fermentação submersa, devido à sua capacidade de crescimento em baixos níveis de água. (BORZANI, et al., 2001; HESSELTINE, 1972). Algumas espécies são capazes de degradar compostos mais refratários, tais como gorduras, óleos, quitina e queratina. A decomposição máxima ocorre quando há suficientemente nitrogênio, fósforo e outros nutrientes essenciais inorgânicos (CARROLL e WICKLOW, 1992). Em genética clássica de fungos, uma espécie *Aspergillus (Emericella) nidulans* tem sido utilizado para elucidar o ciclo parassexual, bem como para compreender conceitos básicos na regulação de vias metabólicas, do ciclo celular, *intron splicing* e polaridade das hifas. Várias espécies contaminam grãos e outros alimentos com metabólitos tóxicos que são uma ameaça para a saúde dos seres humanos e outros animais. Certas espécies de *Aspergillus* também podem infectar seres humanos diretamente causando infecções localizadas e sistêmicas, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (BENNET, 2010).

### 3.5 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

A biomassa celulósica é considerada uma importante fonte de açúcares solúveis para a fermentação e obtenção de combustíveis ou outros produtos químicos. A hidrólise da celulose

e da hemicelulose e a fermentação das pentoses e glicose a etanol são alvos de estudos há vários anos (CANTARELLA et al., 2001). Materiais celulósicos de baixo custo, como palha de trigo, serragem, bagaço de cana-de-açúcar e outros resíduos da agricultura são produzidos em bilhões de toneladas anualmente e podem ser utilizados se esta biomassa for convertida a produtos úteis (BON, GIRIO e PEREIRA JUNIOR, 2008). Os resíduos lignocelulósicos são abundantes fontes de carboidratos e a sua bioconversão tem recebido grande atenção (OJUMU et al., 2003). Tais resíduos são compostos por 30 a 50% de celulose, 15 a 45% de hemicelulose e 20 a 30% de lignina, variando de acordo com o tipo do material (Tabela 1), estágio vegetativo e idade (FERRAZ, 2010). O teor de nitrogênio é muito baixo e a proporção percentual dos componentes também é variável (RAJARATHNAM et al., 1992).

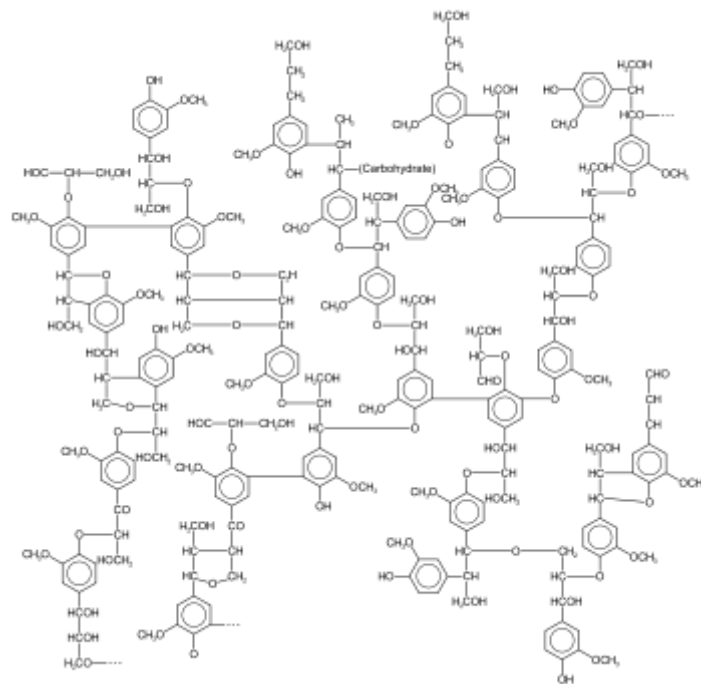
**Tabela 1** - Composição química (porcentagem do teor de celulose, hemicelulose, lignina e outros componentes) de alguns resíduos lignocelulósicos.

Material	Composição química (%)				Referência	
	Lignocelulósico	Celulose	Hemicelulose	Lignina		Outros
Bagaço de cana		42,8	25,9	22,1	7,5	Silva, 2009
Palha de cana		39,8	28,6	22,5	8,6	Oliveira, 2010
Palha de milho		54,4	16,2	23,8	8,0	Bianchi, 1995
Sabugo de milho		41,0	36,0	6,0	14,0	Goldestein, 1981
Palha de trigo		30,0	24,0	18,0	10,0	Kuhad e Singh, 1993
Palha de arroz		43,5	22,0	17,2	11,4	Mussato, 2002
Madeira de Eucalipto		49,4	21,4	27,8	1,5	Junior, 2007
Casca de amendoim		38,0	36,0	16,0	5,0	Kuhad e Singh, 1993

As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza, sendo compreendidas, majoritariamente, pelos materiais agroindustriais, pelos resíduos urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas. Dentre estas, os materiais agroindustriais se destacam pelo caráter de resíduo, conferido por sua obtenção após o processamento de matérias-primas que apresentam maior valor agregado, e pela vocação natural que o Brasil possui para sua geração. O bagaço de cana-de-açúcar, dentre as biomassas consideradas, é a predominante, com uma geração, em 2007, de 147 milhões de toneladas. Igualmente, é notória a quantidade gerada das demais biomassas lignocelulósicas: juntos, no ano de 2007, os materiais apresentados somaram uma massa gerada no Brasil de 606 milhões de toneladas, das quais cerca de 105 milhões de toneladas correspondem à fração celulósica (CASTRO, 2009; SZENGYEL, 2000).

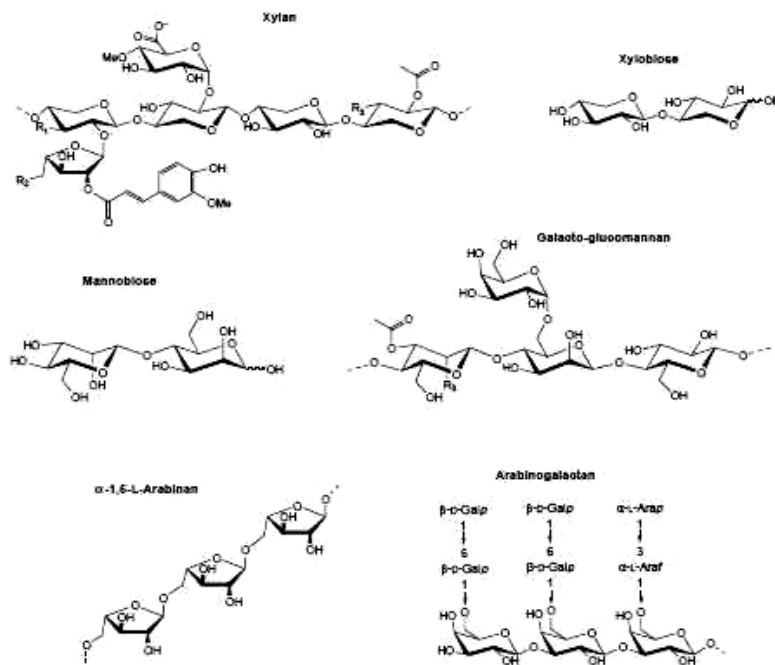
As biomassas lignocelulósicas são constituídas por três principais frações poliméricas: lignina, hemicelulose e celulose, que são unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa resistente a ataques microbianos. Essas frações majoritárias são responsáveis por 97-99% de toda massa seca dos materiais (JEFFRIES, 1990).

**Lignina** – É composta basicamente de unidades de fenilpropano (Figura 2), acopladas por ligações éter biologicamente estáveis, formando uma macromolécula tridimensional e amorfa, que representa de 20% a 30% do total dos lignocelulósicos e 40% do seu peso seco (FERRAZ, 2010; HIGUCHI, 1982; PAULI, 1997). O acoplamento das unidades de fenilpropano não ocorre de forma regular e repetitiva, o que é atribuído ao mecanismo de biossíntese da lignina, que se processa por via radicalar a partir de reação de três diferentes álcoois cinâmílicos precursores (FERRAZ, 2010). Este arranjo estrutural da lignina, sem ligações repetidas, e sua localização envolta da fibra de celulose lhe permite desempenhar a função de cimentante e preservadora (PAULI, 1997). Assim, a lignina representa uma importante barreira física que irá dificultar a ação de enzimas celulolíticas, limitando os sítios de ataques enzimáticos e impedindo a entrada de enzimas de maior peso molecular (RAJARATHNAM et al., 1992). Como a lignina representa um dos maiores estoques de carbono da natureza e é o maior depósito de estruturas químicas aromáticas, ela constitui-se em uma fonte potencial de valiosos insumos para a indústria química, sobretudo como fonte de energia para diversos processos (PEREIRA Jr. et al., 2008).



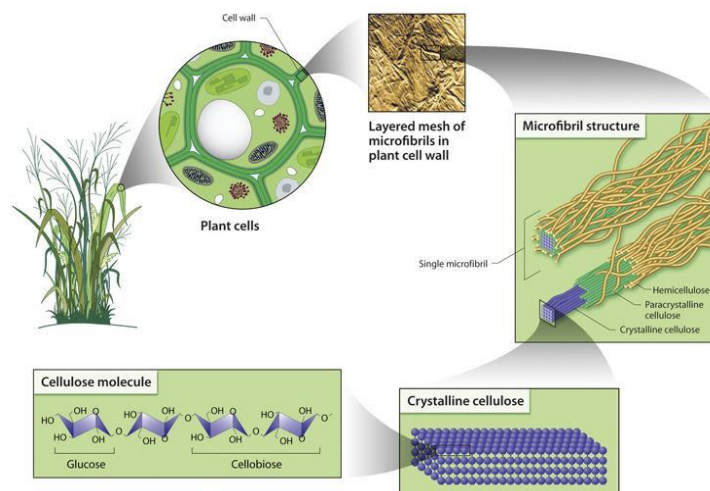
**Figura 2:** Estrutura proposta para lignina de madeira de *Eucalyptus grandis* (PILÓ-VELOSO et al., 1993).

**Hemicelulose** – É composta de polímeros complexos, como anidro-açúcares da glicose, manose e galactose e por xilose e arabinose, podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos e desoxi-hexoses dependendo do material vegetal (Figura 3). Representa 15% a 45% do material lignocelulósico e 20 a 40% do peso seco do vegetal (FERRAZ, 2010). Os arranjos moleculares podem variar bastante, originando compostos ramificados, classificados como xilanas, arabinoxilanas, arabinanas, galactomananas ou mananas, sendo as xilanas e as galactomananas os principais constituintes (BON, GIRIO e PEREIRA JR., 2008; SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997). A variedade de ligações e de ramificações, assim como a presença de diferentes unidades monoméricas, contribui para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações (KOOTSTRA et al., 2009). Difere da celulose, entre outras características, por possuir menor massa molecular, entre 100 e 200 unidades glicosídicas, e por não apresentarem região cristalina, sendo, portanto, mais suscetível a hidrólise química sob condições mais brandas. Os polissacarídeos da hemicelulose estabelecem, ainda, a ligação entre a celulose e a lignina (BON, GIRIO e PEREIRA JR., 2008; SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997).



**Figura 3:** Estrutura básica dos principais componentes presentes na hemicelulose (SHALLOM e SHOHAM, 2003).

**Celulose** – É o polímero natural e renovável mais abundante da Terra, sendo o principal componente da parede celular das plantas e constituindo cerca de 1/3 da matéria orgânica vegetal e 23% a 50% de seu peso seco (ARANTES e SADDLER, 2010; CAO e TAN, 2002; NORKRANS, 1967). Este polímero linear contém até 15.000 unidades de  $\beta$ -D-glicoses unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 carbono-carbono e por ligações de hidrogênio intramoleculares, que formam fibrilas altamente ordenadas e estas, associadas, formam as fibras de celulose (Figura 4), e intermoleculares, que conferem rigidez à parede celular (ARANTES e SADDLER, 2010). A organização estrutural das fibrilas é alternada entre regiões altamente ordenadas, denominadas região cristalina e entre regiões não ordenadas, denominadas região amorfa (BAYER e LAMED, 1992; BON, GIRIO e PEREIRA JUNIOR, 2008). Na região cristalina, as fibras têm maior resistência à tração, ao alongamento e à absorção de solvente que na região amorfa, onde a fibra possui sua maior flexibilidade (VÁSQUEZ et al., 2007). Estas características, juntamente com o envoltório de lignina, conferem à celulose alta força de tensão que permite às células vegetais suportarem uma elevada pressão osmótica e, ao mesmo tempo, confere grande resistência à hidrólise, o que representa um grande desafio para a utilização dos materiais lignocelulósicos em aplicações biotecnológicas, como a produção de etanol de segunda geração. A biodegradação da molécula de celulose está relacionada com a capacidade enzimática dos micro-organismos celulolíticos de penetrar entre as cadeias adjacentes da fibra, atuando em sítios onde a estrutura do substrato é mais acessível, ou seja, onde a fibra teve seu aspecto cristalino alterado para uma morfologia mais amorfa (ARANTES e SADDLER, 2010; BAYER e LAMED, 1992; BEGUIN e AUBERT, 1994).



**Figura 4:** Desenho esquemático da organização estrutural da fibra de celulose (U. S. DOE, 2005).

### 3.5.1 BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Com a crescente demanda de energia integrada com as preocupações ambientais, a produção de energias a partir de fontes renováveis, como a produção de biocombustíveis a partir de resíduos agroindustriais, tem-se mostrado uma alternativa viável para os combustíveis fósseis (DE PAULA et al., 2009).

Dos resíduos agrícolas de maior importância no território nacional, o bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) ocupa uma posição de grande destaque. Apenas em 2006, a agroindústria sucroalcooleira brasileira, composta por aproximadamente 300 usinas, processou  $3,84 \times 10^8$  de toneladas de cana. Em geral, o processamento de uma tonelada de cana-de-açúcar gera cerca de 290 kg de bagaço (CUNHA e SILVA, 2001; GÁMES et al., 2006; RAMOS, 2003).

Uma projeção da produção de cana-de-açúcar até a safra de 2012/13 (Tabela 2) revela que a produção, no Brasil, ultrapassará 600 milhões de toneladas de cana, gerando cerca de 190 milhões de toneladas de bagaço (KITAYAMA, 2008; OLIVERIO, 2007; SILVESTRIN, 2009).

**Tabela 2** – Produção nacional de cana-de-açúcar e bagaço, expressa em milhões de toneladas, para as safras de 2006 a 2013.

Safra	Cana	Bagaço
2006/07	430	120
2007/08	478	132
2008/09	514	142
2009/10	558	154
2010/11	601	166
2011/12	647	179
2012/13	696	192

Fonte: Adaptado de KITAYAMA (2008); OLIVERIO (2007); SILVESTRIN (2009).

O bagaço é um subproduto resultante da moagem dos colmos da cana-de-açúcar. É obtido na saída do último moinho das usinas e destilarias, e constitui um conjunto de partículas de diferentes tamanhos, que oscilam entre 1 e 25 mm, a depender do número de moagens realizadas e do tamanho dos equipamentos. O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* é



composto por 36% de celulose, 32% de hemicelulose, 19% de lignina e 13% de ceras, proteínas e cinzas (SCHLITTLER, 2006).

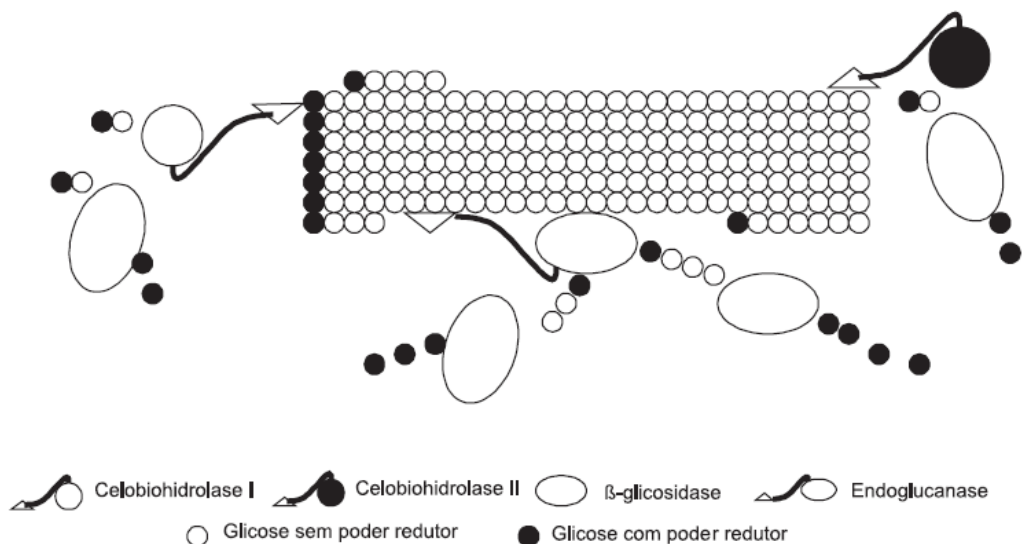
A fração celulósica do bagaço pode ser bioconvertida, por micro-organismos celulolíticos, a etanol através da hidrólise enzimática. Entretanto, a presença de hemicelulose e lignina dificulta o acesso dos reagentes de hidrólise à celulose. Assim, muitas vezes, para uma eficiente hidrólise enzimática, é necessário primeiramente submeter o material lignocelulósico a um pré-tratamento, facilitando o acesso das enzimas à fibra de celulose. Os processos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos ou uma combinação de todos esses, o que dependerá do grau de separação requerido e do fim proposto (FERRAZ et al., 1994; CARRASCO, 1992; McMILLAN, 1994).

### 3.7 CELULASES

As enzimas são proteínas que estão presentes em todos os sistemas biológicos e tem a função de catalisar reações entre componentes químicos com elevada especificidade sobre o substrato. Atualmente, são os principais alvos das pesquisas em Biotecnologia devido ao seu papel decisivo em mecanismos celulares e a sua potencialidade em substituir processos químicos convencionais, viabilizando economicamente diversos processos tecnológicos. (ÂNGELO, 2010; SENA et al., 2006).

As celulasas são enzimas responsáveis pela degradação da celulose que constituem o segundo maior grupo de carboidrases exploradas comercialmente. Apenas nos Estados Unidos, no fim da década de 90, foi estimado um investimento de US\$ 400 milhões no mercado de celulasas aplicadas em hidrólise de biomassa. No contexto atual, as celulasas produzidas por fungos tem sido as mais estudadas e exploradas industrialmente, sobretudo para reutilização de resíduos lignocelulósicos provenientes da agricultura e de processos industriais para produção de etanol e de polpa de celulose, por exemplo. A ideia é utilizar os resíduos agroindustriais como substratos para obtenção de celulasas a partir de fermentação microbiana. Embora a maior parte dos trabalhos esteja voltada para produção de enzimas de *Trichoderma reesei*, muitas outras espécies tem apresentado potencial relevante para produção de celulasas, como *Neurospora crassa* e espécies do gênero *Curvularia* (ÂNGELO, 2010).

As celulases atuam nas ligações glicosídicas  $\beta$  (1,4) das microfibrilas de celulose, resultando na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose. (DILLON, 2004). Porém, a conversão enzimática é dificultada devido a composição da própria celulose, com fibras cristalinas insolúveis, embebidas em uma matriz de hemicelulose e lignina e pontes de hidrogênio que mantêm as moléculas unidas, o que reduz a acessibilidade das enzimas hidrolíticas (BEGUIN, 1994). Assim, a completa degradação da celulose requer ação sinérgica de um complexo de enzimas celulolíticas composto por endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases, conforme mostra a figura 5 (ÂNGELO, 2010).



**Figura 5:** Modo de ação das principais enzimas celulolíticas (CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

**Endoglucanases** – A 1,4- $\beta$ -D-glucana-4-glucano-hidrolase é a enzima do complexo celulolítico que dá início à hidrólise da molécula de celulose. As endoglucanases hidrolisam randomicamente as ligações glicosídicas da estrutura amorfa da fibra de celulose, liberando oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização e novos terminais redutores e não redutores (LYND et al., 2002). Martins (2005) afirma que a forma em chave do sítio ativo das endoglucanases permite a ação da enzima ao longo da cadeia de celulose e a redução do grau de polimerização (GP). As regiões amorfas são mais acessíveis e, conseqüentemente, mais prontamente atacadas, pois as cadeias não estão envolvidas com interações de hidrogênio intermoleculares fortes como as que ocorrem em regiões cristalinas, assim há uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas das cadeias de celulose.

**Exoglucanases** – É um grupo formado por duas enzimas distintas: 1,4- $\beta$ -D-glucanoglucano-hidrolase (glucanohidrolase) que libera glicose diretamente do polímero e 1,4- $\beta$ -D-glucanocelobio-hidrolase (celobiohidrolase) que catalisa a hidrólise dos terminais redutores (enzimas do tipo I) e não redutores (enzimas do tipo II) da fibra celulósica e oligossacarídeos com GP>3 em celobiose (LYND et al., 2002). As celobiohidrolases participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis pela amorfogênese, que envolve uma ruptura física do substrato, acarretando na desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais. Este fenômeno promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar amorfas as regiões cristalinas do polímero, expondo-as às celulasas (ZHANG e LYND, 2004). O sítio ativo das celobio-hidrolases possui a forma de um túnel por onde a cadeia de celulose penetra e sofre hidrólise de suas ligações glicosídicas terminais, liberando celobiose na maioria dos casos (MARTINS, 2005). As celobiohidrolases geralmente são inibidas pelo seu produto de hidrólise – celobiose (CARVALHO, 2007).

**$\beta$ -Glicosidases** – A  $\beta$ -glicosídeo glucohidrolase tem a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (GP<7) em glicose (CASTRO, 2006; LYND et al., 2002; LYND e ZHANG, 2002). É semelhante às celobio-hidrolases, sofrem inibição por seu produto de hidrólise (AWAFO, 1997).

São distinguidas pelo menos três formas de sinergia entre as enzimas celulolíticas: sinergia Endoglucanase/Exoglucanase - a endoglucanase, atua nas regiões amorfas da fibra, disponibilizando terminais redutores e não redutores para atuação das celobio-hidrolase do tipo I e do tipo II, respectivamente; sinergia Exoglucanase/Exoglucanase - as celobio-hidrolase do tipo I e do tipo II atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados por ação da endoglucanase; sinergias Exoglucanase/ $\beta$ -glicosidase e Endoglucanase/ $\beta$ -glicosidase - como seus produtos de hidrólise, a celobio-hidrolase e a endoglucanase liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos para a  $\beta$ -glicosidase (CASTRO e PEREIRA JR., 2010; BHAT e BHAT, 1997; LYND et al., 2002).

### 3.8 APLICAÇÕES INDUSTRIAIS

Foi durante a Segunda Guerra Mundial que as celulasas começaram a ser estudadas, após a deterioração de diversos equipamentos, constituídos de algodão, dos soldados das forças armadas norte-americanas. Dr. Elwyn T. Reese liderou uma equipe de oito

pesquisadores que passaram a buscar explicações e soluções para o problema. Posteriormente, o grupo isolou uma linhagem codificada como QM6a, de um fungo filamentosos, identificado posteriormente como *Trichoderma viride*, que era capaz de excretar enzimas degradadoras de celulose (CASTRO e PEREIRA JR., 2010). Porém, a utilização das celulasas pela indústria começou somente na década de 80, inicialmente na fabricação de ração animal, e depois nas indústrias alimentícias. Seu uso foi expandido para a indústria têxtil, de detergentes, de fármacos, papelaria e, atualmente, para indústria de biocombustíveis (BHAT, 2000).

As celulasas são facilmente produzidas em larga escala via fermentação no estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS), utilizando resíduos agroindustriais como matéria-prima. Na fermentação submersa, os substratos são dissolvidos em meio líquido, enquanto que, na fermentação em estado sólido, o micro-organismo cresce em substratos sólidos umedecidos, sob rígido controle da água (CARVALHO, 2007). As celulasas são expressas por diversos micro-organismos que oferecem infinitas possibilidades de modos de ação, nas mais diversas condições (SENA et al., 2006). Por isso, as celulasas constituem atualmente uma parcela significativa do mercado mundial de enzimas, sendo produzida principalmente por fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* (BHAT, 2000).

**Ração Animal** - Inicialmente a adição de  $\beta$ -glucosidases em rações animais não proporcionou muito sucesso devido ao alto custo de produção. Porém, a viabilidade econômica do processo de tratamento enzimático da ração animal aumentou após a descoberta de linhagens superprodutoras e com o desenvolvimento de processos mais eficientes (TOLAN e FOODY, 1999). O tratamento enzimático da ração animal apresenta dois benefícios importantes: hidrolisa parcialmente a parede celular de plantas, liberando açúcares rapidamente e aumenta a digestibilidade, além de modificar a biomassa para a recuperação mais eficiente de outros componentes como o amido (BHAT, 2000).

**Indústria Alimentícia** - Na indústria alimentícia, as celulasas tem uma ampla gama de aplicações, sendo utilizadas na extração e clarificação de sucos de frutas, atuando em conjunto com outras enzimas, como pectinases e  $\alpha$ -amilases, para promover a hidrólise parcial de componentes da parede celular, reduzindo a viscosidade e mantendo a textura dos sucos; na fabricação de pães, biscoitos e bolos, de forma a melhorar a textura, pela hidrólise de gomas, e permitir uma melhor distribuição dos aromas; na extração de óleo de oliva, associadas à hemicelulasas e pectinases para melhorar a produção e a qualidade do azeite; na produção de vinhos, as celulasas aumentam o aroma e clarificação dos vinhos, pela hidrólise de precursores glicosilados e na produção da cerveja para o aumento da qualidade, onde

processos como o clareamento e filtração podem ser melhorados. No entanto, a ação das celulases deve se dar de forma controlada, para evitar prejuízos estruturais às massas e alterações sensoriais indesejadas. As celulases mais usadas na indústria de bebidas são as de *Trichoderma*, devido ao seu baixo pH. Celulases de *Aspergillus niger* também tem ampla aplicação na indústria de alimentos (BHAT, 2000; GRIGORESK-LIMA, 2009; TOLAN e FOODY, 1999).

**Indústria Têxtil** - Na indústria têxtil, as celulases tornaram-se importantes devido a sua capacidade de modificar as fibras de celulose de uma forma controlada, aumentando assim a qualidade dos produtos e reduzindo a quantidade de efluentes produzidos. As enzimas celulásicas, na indústria têxtil, podem ser utilizadas nos processos de bioestonagem e de biopolimento (BHAT, 2000; BELGHITH, ELLOUZ-CHAABOUNI e GARGOURI, 2001).

O processo de bioestonagem para o amaciamento e desbotamento de tecidos envolve a ação de endoglucanases ácidas e neutras. As enzimas hidrolisam superficialmente as fibras de celulose proporcionando assim um amolecimento no tecido e permitindo a liberação do tingimento. A bioestonagem substituiu o processo de *stonewashing*, na década de 70, que era realizado com pedras pomes e oxidantes, tornando o processo de amaciamento e desbotamento mais produtivo, menos caro, porque requer menor investimento em máquinas, e gerando efluentes limpos (TOLAN e FOODY, 1999; CASTRO, 2006).

O processo de biopolimento é aplicado a diversos tipos de tecidos como algodão, linho, lã, viscose e *lyocell*, com o objetivo de remover microfibras (fiapos) na superfície dos tecidos. No biopolimento, os tecidos são recobertos por celulases diluídas, em tambores rotatórios que giram a uma velocidade de 50-100 rpm, pH 5, a 40-50 °C por 15-30 min ideal para promover forças de cisalhamento que auxiliam na remoção das fibras. O processo antes utilizado compreendia força mecânica, sendo bastante abrasivo. O uso das celulases confere maior maciez, brilho e uniformidade da cor dos tecidos (MIETTINEN-OINONEN et al., 2004; TOLAN e FOODY, 1999).

**Indústria de Detergentes** - As indústrias de detergentes utilizam as celulases pela sua capacidade de degradar fibras celulósicas de maneira controlada e ordenada. As celulases, adicionadas em detergentes, realizam cortes finos nas microfibrilas, os quais tendem a esticar as fibras do algodão. Assim, aumentam o brilho das cores, removem sujeiras das fibras de algodão, aumentam a maciez dos tecidos e amenizam o desgaste dos tecidos, provocado pelo aparecimento de fiapos e pelotas, após sucessivas lavagens. (BHAT, 2000). As enzimas utilizadas nesse setor da indústria devem ser ativas em valores de pH alcalinos (8-9), suportar

possíveis efeitos inibitórios gerados por surfactantes, alvejantes e enzimas proteásicas e suportar temperaturas acima de 50 °C. (BHAT, 2000; TOLAN e FOODY, 1999).

**Indústria Papeleira** - As celulases são usadas na indústria de polpa e papel na remoção de tinta e água dos papéis recicláveis. A remoção de tinta ou biodescoramento do papel reciclável ocorre através da submersão do papel a uma etapa de polpação em água, onde as celulases são adicionadas e causam o desprendimento das partículas de tinta, seguida por bombeamento da polpa para uma coluna de flotação, onde o ar distribuído na base ascende, carregando as partículas de tinta desprendidas por ação das celulases. A tinta é então removida da superfície do sistema e a polpa pré-branqueada é alvejada pela utilização de peróxido de hidrogênio, hidrossulfito de sódio ou alvejantes mais agressivos, como ozônio e dióxido de cloro. As celulases reduzem ainda o uso de surfactantes e produtos químicos. Na remoção de água de polpas celulósicas de papéis reciclados, as celulases são incubadas junto às polpas para solubilizar suas partículas finas, que são altamente absorventes e a água é removida pela combinação de prensagem, vácuo e aquecimento da polpa. Isso provoca a remoção mais rápida da água e secagem do papel, diminuindo, assim, o custo do processo com a redução de energia (TOLAN e FOODY, 1999).

**Indústria de Bioetanol** - Diante do contexto ambiental atual e da iminência de uma crise energética, a busca por uma fonte de energia alternativa e viável economicamente entrou em evidência na indústria de combustíveis (ZHANG e SMITH, 2007). Uma das alternativas disponíveis é a produção de bioetanol de segunda geração a partir de material lignocelulósico proveniente de resíduos agroindustriais. Uma ampla diversidade de resíduos agroindustriais pode ser utilizada para a produção de biocombustíveis de segunda geração (MACEDO et al., 2008). Nos Estados Unidos e na Europa estão em andamento os principais programas de pesquisas que visam à produção de bioetanol de segunda geração, ainda em escala experimental, mas seu sucesso poderia tornar o bioetanol um combustível passível de ser produzido em qualquer região, aproveitando a alta disponibilidade dos resíduos. (MACEDO et al., 2008).

As tecnologias para a obtenção de bioetanol de segunda geração, produzido a partir de materiais lignocelulósicos, envolvem a hidrólise da biomassa em açúcares fermentáveis e a fermentação destes açúcares. Para isso, entretanto, é necessário o uso de tecnologias complexas e multifásicas, com base no uso de etapas de tratamento ácido e/ou enzimático para hidrólise dos açúcares e remoção da lignina (PEREIRA JR. et al., 2008).

As celulasas possuem um importante papel neste processo porque hidrolisam a celulose, liberando glicose com ganhos energéticos e ambientais expressivos em relação ao tratamento ácido, que resultaria em substâncias tóxicas como, por exemplo, derivados furfurais (TOLAN e FOODY, 1999).

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho teve por objetivo verificar o potencial biotecnológico de fungos filamentosos celulolíticos isolados da restinga de Guaibim - BA em formação arbustiva fechada.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Para a realização dos estudos na área de bioprospecção de fungos celulolíticos o presente trabalho teve como principais metas:

- 1) Isolar e identificar, em nível de gênero, fungos filamentosos celulolíticos de formações arbustivas fechadas na restinga de Guaibim;
- 2) Quantificar a atividade de celulasas (FPase e CMCase) em meio quimicamente definido;
- 3) Selecionar o isolado mais promissor quanto à capacidade de produção de celulasas para estudos posteriores de fermentação;
- 4) Estudar a produção de celulasas utilizando bagaço de cana-de-açúcar *in natura* como fonte de carbono e milhocina sólida como fonte de nitrogênio.

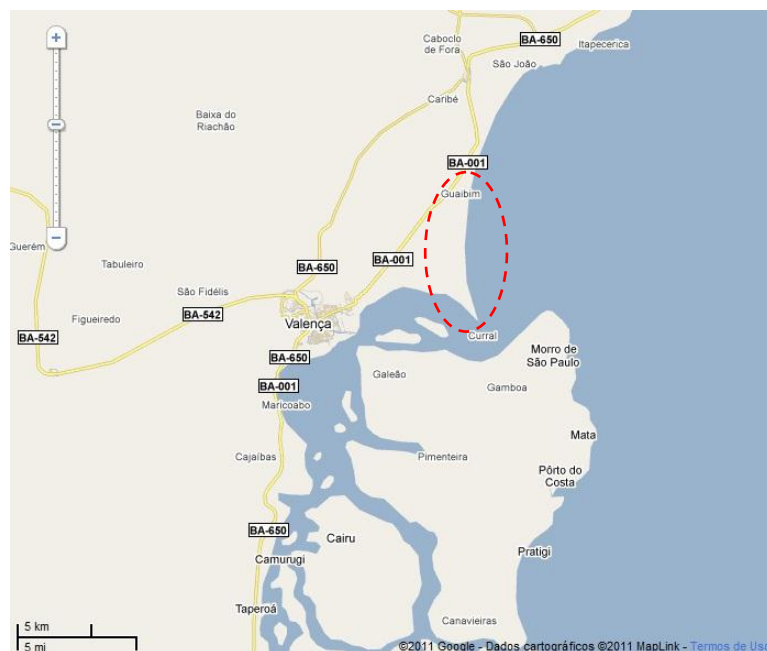
## 5. METODOLOGIA

### 5.1 ÁREA DE ESTUDO

A restinga de Guaibim (Figura 6) é uma Área de Proteção Ambiental (APA), criada pelo Decreto Estadual nº 1.164 de 11 de maio de 1992. Constituída por uma faixa territorial de relevância ambiental devido à formação de um sistema de terraços marinhos, entre a foz do rio Jiquiriçá e o Canal de Taperoá, apresenta áreas de restinga, manguezais e remanescentes de Mata Atlântica. A APA de Guaibim abrange uma área total de 20 km<sup>2</sup>, sob administração do Centro de Recursos Ambientais – CRA.

Na APA de Guaibim, os principais conflitos ambientais são: o lançamento de esgoto doméstico nos corpos hídricos, a ocupação desordenada e o desmatamento.

As principais vias de acesso à região são: a partir de Salvador, pela BR 324 até as imediações de Amélia Rodrigues, depois pela BR 101 até o entroncamento, seguindo para Valença e de lá para Guaibim; a partir de Salvador através de *Ferry-Boat*, cruzando-se a Ilha de Itaparica e tomando a BA 001, seguindo para Valença.



**Figura 6:** Localização da APA de Guaibim (linha pontilhada), município de Valença – Bahia.



## 5.2 COLETA DO SOLO

Foram realizadas coletas mensais, entre fevereiro e maio de 2011, em 8 pontos diferentes equidistantes aproximadamente um quilômetro. Em cada ponto foram obtidas duas ou mais amostras diferentes. O solo foi coletado a 10 cm de profundidade, após a remoção da serapilheira, por uma pá estéril e foi armazenado em sacos plásticos estéreis, etiquetados e transportados para o Laboratório de Biotecnologia Microbiana na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), para posterior manipulação. Todos os pontos de coleta foram georeferenciados (Tabela 3).

**Tabela 3** – Localização dos pontos de coleta na restinga de Guaibim, município de Valença-Ba.

Pontos	Localização
1	S 13°18.942'/W 038°58.036'
2	S 13°18.975'/W 038°58.041'
3	S 13°18.413'/W 038°58.012'
4	S 13°18.471'/W 038°58.023'
5	S 13°18.352'/W 038°58.020'
6	S 13°18.321'/W 038°58.023'
7	S 13°18.059'/W 038°57.571'
8	S 13°18.031'/W 038°57.568'

## 5.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS CELULOLÍTICOS

Para o isolamento dos fungos, foi adotada a Técnica das Diluições Seriadas, onde 10 g de solo foram adicionados a 90 mL de solução salina 0,85% (p/v) e agitados por 20 minutos. A partir da amostra original, 1 mL foi adicionado a 9 mL de solução salina 0,85% (p/v) em sucessivas repetições até a diluição  $10^{-3}$ . Alíquotas de 0,5 mL foram transferidas, com auxílio de pipetas automáticas estéreis, para placas de Petri (em triplicata) contendo meio seletivo de sais minerais, suplementado com 1% (p/v) de celulose microcristalina (única fonte de carbono) e com antibiótico clorafenicol (150 mg/L), semeando-se com alça de Drigalsk. As placas foram incubadas na estufa a 28 °C, por 10 dias.

As colônias com características de fungos foram selecionadas e transferidas, com auxílio de alça de inoculação, para placas de Petri contendo meio de malte (20%) para serem fotografados e para placas contendo meio de celulose microcristalina 1% (p/v) para serem conservados a temperatura ambiente em frascos criogênicos de 2 mL com água destilada

estéril (CASTELLANI, 1967). Para cada amostra de solo coletada foram realizados 3 isolamentos sob condições padronizadas (como descrito anteriormente), até a observação de 80% de semelhança entre os morfotipos encontrados em cada isolamento.

Para identificação foi realizada a técnica do microcultivo (cultivo em lâminas de microscopia) em meio ágar *sabouraud*. As lâminas foram acondicionadas em placas de Petri e incubadas à 28°C por 5-8 dias. A identificação morfológica dos fungos, em nível de gênero, ocorreu mediante observações com microscópio óptico binocular em aumento de 400x comparando-se com literatura-padrão por meio de chaves de identificação (BARNETT e HUNTER, 1999).

#### 5.4 VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL CELULOLÍTICO DOS ISOLADOS

Os isolados foram testados quanto ao seu potencial celulolítico em erlenmeyers de 500 mL contendo 120 mL do meio de Mandels e Weber (1969) pH 6,0, suplementado com 0,6 g de Papel Filtro Whatman n° 1 picado (1 x 1cm). Em seguida foi inoculada uma alçada de esporos dos isolados que estavam armazenados em frascos criogênicos e os erlenmeyers foram agitados a 180 rpm, por 7 dias, à 30°C. Alíquotas (2,0 mL) foram retiradas diariamente e analisadas.

##### 5.4.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE CELULASE TOTAL - FPase

A atividade de celulase total foi determinada através da quantificação dos açúcares redutores produzidos durante a incubação de 0,5 mL do sobrenadante enzimático em 1,0 mL tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8, contendo uma tira de papel filtro (1 x 6cm), a 50°C durante 60min (GHOSE, 1987), pelo método do ácido dinitrosalicílico-DNS (MILLER, 1959). A leitura das atividades foi feita em espectrofotômetro a 550nm e para confecção da curva padrão, foi realizada solução de 0,04M de glicose. Os resultados são apresentados em  $U.L^{-1}$  onde cada unidade (U) corresponde à quantidade de  $\mu$ moles de açúcares redutores liberados por minuto de reação, nas condições do ensaio. O cálculo da atividade enzimática (AE) foi realizado de acordo com a fórmula:  $AE = (MT_f - MT_o) \times \alpha \times D/\Delta t$ , onde:

$MT_f$  = média dos ensaios no tempo final;

$MT_0$  = média dos ensaios no tempo inicial;

$\alpha$  = coeficiente angular da curva padrão do DNS;

$D$  = diluição da amostra;

$\Delta t$  = tempo de reação da enzima.

#### **5.4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENDOGLUCANASE - CMCase**

A atividade de endoglucanase foi determinada através da medida dos açúcares redutores produzidos durante a incubação de 0,7 mL do extrato enzimático com 0,7 mL de solução 2,0% (p/v) de carboximetilcelulose (CMC) em tampão citrato de sódio 50mM pH 4,8, a 50°C durante 20 min, pelo método do ácido dinitrosalicílico-DNS (MILLER, 1959). A leitura das atividades foi feita em espectrofotômetro a 540 nm e para confecção da curva padrão, foi realizada solução de 0,04M de glicose. Os resultados são apresentados em  $U.L^{-1}$  onde cada unidade (U) corresponde à quantidade de  $\mu$ moles de açúcares redutores liberados por minuto de reação, nas condições do ensaio. O cálculo da atividade enzimática (AE) foi realizado de acordo com a fórmula:  $AE = (MT_f - MT_0) \times \alpha \times D / \Delta t$ .

#### **5.5 SUSPENSÃO DE ESPOROS**

O isolado promissor foi reativado em meio de malte 20% e mantido na forma de suspensão de esporos, padronizada ( $7,7 \times 10^8$  UFC/mL), em glicerol 20%, a temperatura de -18°C (HOPWOOD et al., 1985).

#### **5.6 PRODUÇÃO DE CELULASES UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA E MILHOCINA**

O isolado promissor foi cultivado em frascos erlenmeyers (100 mL) contendo 20 mL de meio de sais minerais (pH 7,0) desenvolvido por Da Vinha et al. (2007), suplementado com diferentes concentrações das fontes de carbono e nitrogênio (Tabela 4), de acordo com a

matriz do planejamento fatorial Delineamento Composto Centra Rotacional - DCCR 2<sup>3</sup> (Tabela 5), segundo Rodrigues e Iemma (2009). Os frascos foram inoculados de acordo com metodologia utilizada por Nascimento et al. (2002, 2009), sendo incubados a 30°C e agitados a 200 rpm por 5 dias. Os sobrenadantes foram coletados diariamente, sendo centrifugados, filtrados e analisados.

**Tabela 4** – Relação dos valores reais dos níveis da composição da matriz do planejamento fracionado.

<b>Nível</b>	-1,68	-1	0	+1	+1,68
<b>Inoculo (10<sup>8</sup>) µL</b>	13,2	20	30	40	46,8
<b>% Fonte de C</b>	0,82	1,5	2,5	3,5	4,18
<b>% Fonte de N</b>	0,16	0,5	1,0	1,5	1,84

A produção de celulases foi avaliada utilizando como fonte de carbono: (i) bagaço de cana *in natura* (triturado e peneirado) e como fonte de nitrogênio: (i) milhocina sólida.

**Tabela 5** – Planejamento do tipo DCCR 2<sup>3</sup> para produção de celulases.

<b>Ensaio</b>	<b>Fonte C</b>	<b>Fonte N</b>	<b>Inoculo</b>
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0

## 5.7 OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO

A variável de menor importância estatística (fonte de carbono) foi fixada no valor da melhor atividade enzimática 0,164g (0,82%) e alteraram-se as concentrações das variáveis mais significativas (concentração de fonte de N e o volume do inoculo), conforme a tabela 6. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software STATSOFT 7.0®.

**Tabela 6** - Relação dos valores reais dos níveis da composição da matriz do planejamento fracionado.

<b>Nível</b>	-1,41	-1	0	+1	+1,41
<b>Inoculo (10<sup>8</sup>) µL</b>	25,9	30	40	50	54,1
<b>% Fonte de N</b>	0,8	1	1,5	2	2,2

Um novo planejamento fatorial DCCR 2<sup>2</sup> foi conduzido após análise das variáveis com maior importância estatística para otimização das condições de produção de celulases (Tabela 7).

**Tabela 7** - Planejamento do tipo DCCR 2<sup>2</sup> para otimização da produção de celulases.

<b>Ensaio</b>	<b>Fonte de N</b>	<b>Inoculo</b>
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Para confirmar os resultados indicados pelo planejamento fatorial, foram realizados quatro ensaios em triplicatas, na região indicada como ótima para produção de CMC<sub>Case</sub>, dentro da matriz estudada. Os ensaios foram realizados nas mesmas condições da otimização, fixando o volume do inoculo em 40 µL e variando a concentração da fonte de nitrogênio (2,2%, 2,3%, 2,4%, e 2,5%).

## **5.8 DETERMINAÇÃO DO PERFIL ÓTIMO DE TEMPERATURA**

A determinação do perfil ótimo de temperatura foi realizada sob as mesmas condições descritas no item 5.4.2. As temperaturas de incubação variaram de 10 em 10 graus num intervalo de 30 a 90°C. A mistura reacional foi incubada em banho-maria a pH 4,8, nas respectivas temperaturas (GRIGOREVSKI-LIMA et al., 2005). A dosagem dos açúcares redutores produzidos após a atividade enzimática foi determinada pelo método DNS (MILLER, 1959).

## **5.9 DETERMINAÇÃO DO PERFIL ÓTIMO DE pH**

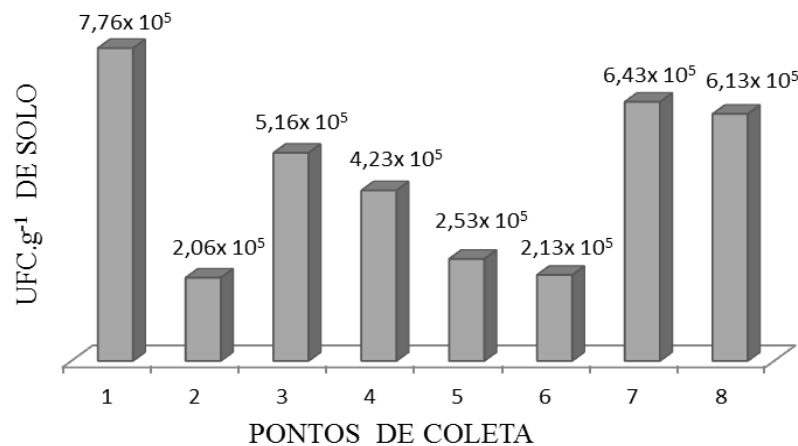
Para o estudo do efeito do pH, a atividade foi determinada na temperatura ótima obtida a partir do item anterior. A mistura reacional foi incubada em banho-maria, com as faixas de pH variando de 2,0 a 10,0, utilizando como tampões: Glicina-HCl 50 mM (pH 2,0 e 3,0), Citrato de sódio 50 mM (pH 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0), Fosfato 50 mM (pH 6,0; 7,0 e 8,0), Tris-HCl 50 mM (pH 8,0 e 9,0) e Glicina-NaOH (pH 9,0 e 10,0).

Os tampões foram preparados de acordo com os procedimentos descritos por COLOWICK e KAPLAN (1995). A mistura reacional foi incubada em banho-maria, nos respectivos pH e, após o tempo de reação, a atividade foi interrompida em banho de gelo. A dosagem dos açúcares redutores produzidos após atividade enzimática foi determinada pelo método DNS (MILLER, 1959).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS CELULOLÍTICOS

Foram isolados 50 fungos filamentosos celulolíticos da restinga de Guaibim, distribuídos entre os 8 pontos de coleta. O valor de Unidades Formadoras de Colônias por grama de solo obtido nos diferentes pontos amostrados na formação arbustiva fechada da restinga de Guaibim está sintetizado na figura 7.



**Figura 7:** Unidades formadoras de colônia (UFC.g<sup>-1</sup> de solo) para os diferentes pontos de coleta.

Os valores de UFC.g<sup>-1</sup> de solo aqui obtidos são considerados elevados em relação à ambientes como Caatinga e Manguezal,  $1,23 \times 10^3$  UFC.g<sup>-1</sup> e  $2,73 \times 10^2$  UFC.g<sup>-1</sup>, respectivamente (CAVALCANTI et al., 2006; GOMES, 2007). Resultados semelhantes foram encontrados por Tauk-Tornisielo et al., (2005) na Mata Atlântica,  $2,5$  a  $3,8 \times 10^5$  UFC.g<sup>-1</sup>. De acordo com Cardoso (1992) nos ecossistemas estáveis como em solo sob mata existe uma tendência de a comunidade microbiana ser maior numericamente e em termos de diversidade.

Dos fungos isolados, 72% (36 isolados) foram identificados em nível de gênero. A maioria dos fungos identificados pertence ao filo Ascomycota, o maior filo em número de espécies do reino *Fungi* (LEITE, 2010). Os gêneros dominantes, em ordem decrescente, foram: *Penicillium* (21 isolados), *Aspergillus* (7 isolado) e *Trichoderma* (5 isolados). Os gêneros *Absidia*, *Paecilomyces* e *Rizopus* apresentaram apenas um isolado cada. Os demais

fungos não foram identificados por não apresentarem estruturas reprodutivas após o período de incubação, sendo visualizadas apenas estruturas filamentosas ao microscópio (Tabela 8).

**Tabela 8** – Identificação dos isolados da formação arbustiva fechada da Restinga de Guaibim – BA. NI = Não identificado.

<b>Isolado</b>	<b>Gênero</b>	<b>Isolado</b>	<b>Gênero</b>
IS-1	<i>Penicillium</i>	IS-26	<i>Penicillium</i>
IS-2	<i>Trichoderma</i>	IS-27	<i>Aspergillus</i>
IS-3	NI	IS-28	NI
IS-4	NI	IS-29	NI
IS-5	NI	IS-30	<i>Aspergillus</i>
IS-6	<i>Penicillium</i>	IS-31	NI
IS-7	NI	IS-32	<i>Penicillium</i>
IS-8	<i>Penicillium</i>	IS-33	<i>Trichoderma</i>
IS-9	<i>Trichoderma</i>	IS-34	<i>Trichoderma</i>
IS-10	NI	IS-35	<i>Aspergillus</i>
IS-11	NI	IS-36	<i>Aspergillus</i>
IS-12	NI	IS-37	<i>Aspergillus</i>
IS-13	<i>Penicillium</i>	IS-38	<i>Aspergillus</i>
IS-14	NI	IS-39	<i>Penicillium</i>
IS-15	<i>Penicillium</i>	IS-40	<i>Penicillium</i>
IS-16	<i>Absidia</i>	IS-41	<i>Penicillium</i>
IS-17	<i>Aspergillus</i>	IS-42	<i>Penicillium</i>
IS-18	<i>Penicillium</i>	IS-43	<i>Penicillium</i>
IS-19	<i>Penicillium</i>	IS-44	<i>Penicillium</i>
IS-20	<i>Penicillium</i>	IS-45	<i>Penicillium</i>
IS-21	<i>Paecilomyces</i>	IS-46	<i>Penicillium</i>
IS-22	<i>Trichoderma</i>	IS-47	<i>Penicillium</i>
IS-23	NI	IS-48	<i>Penicillium</i>
IS-24	<i>Rhizopus</i>	IS-49	<i>Penicillium</i>
IS-25	NI	IS-50	NI



A habilidade de sobrevivência, adaptabilidade e estabelecimento de micro-organismos em um habitat específico é determinada pelo ambiente. A sobrevivência da microbiota é influenciada, isoladamente ou em combinação, por um número de fatores abióticos. A concentração de hidrogênio é um dos maiores fatores abióticos influenciando a capacidade de crescimento e a composição dos fungos; além deste, a temperatura, a salinidade, a disponibilidade, a diversidade de substratos e a quantidade de propágulos na água são fatores que também podem influenciar a composição de fungos em um ambiente específico (JAITLEY, 1987; JONES e ALIAS, 1997).

Não há na literatura relatos sobre fungos filamentosos celulolíticos isolados de formação arbustiva fechada de ambiente de restinga. Os estudos são direcionados à ambientes como manguezal (GOMES, 2007), Caatinga (CAVALCANTI et al., 2006), Mata Atlântica (RUEGGER e TAUKE-TORNISIELO, 2002), agroecossistemas, mata nativa e áreas de reflorestamento (COELHO et al., 2008) e serapilheira (AUER et al., 2006), o que dificulta a comparação dos resultados aqui obtidos com outros publicados. Apenas Andrade (2010), estudou a comunidade fúngica de moita e entremoita da restinga de Guaibim, obtendo resultado semelhante ao encontrado neste estudo, 59 isolados. O número de fungos isolados de sedimento de restinga obtidos neste trabalho é razoável quando comparado ao número de fungos isolados de sedimentos de outros ambientes. Gomes (2007) isolou 50 espécies de fungos filamentosos de sedimentos do manguezal, Cavalcanti et al. (2006) obteve 96 espécies isoladas de sedimentos da Caatinga e Ruegger e Tauke-Tornisielo (2002) obtiveram 80 isolados de sedimento de Mata Atlântica.

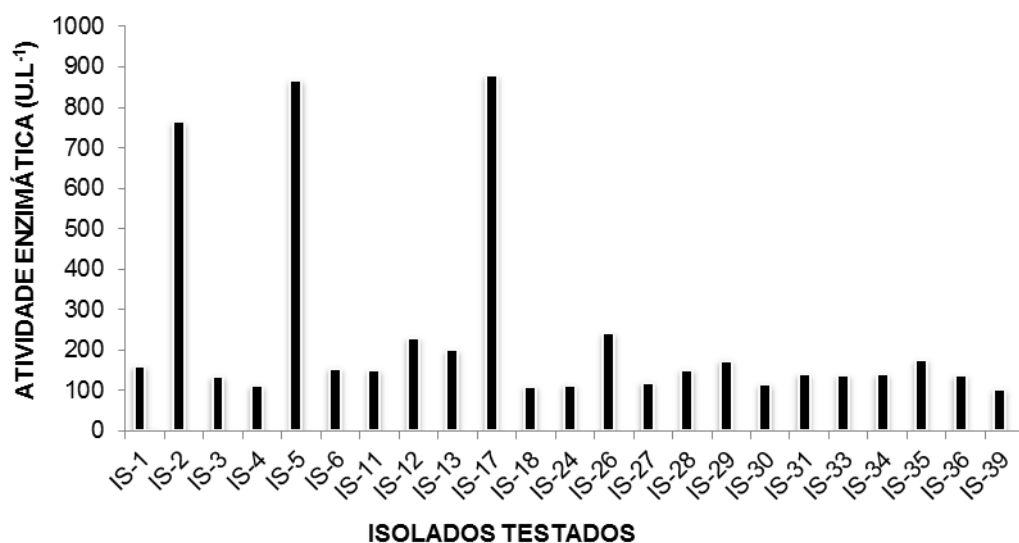
O fato de um maior número de isolados pertencerem aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* corrobora com dados descritos na literatura como sendo os gêneros mais frequentemente isolados do solo (ROITMAN et al., 1991). Estes gêneros, junto com *Trichoderma*, também foram os mais frequentes em moita e entremoita de ambiente de restinga (ANDRADE, 2010). Espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*, também foram identificadas em trabalhos realizados em florestas perturbadas, não perturbadas e reservas ecológicas, evidenciando sua distribuição cosmopolita (SCHOENLEIN-CRUSIUS e MILANEZ, 1998).

## 6.2 VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL CELULOLÍTICO DOS ISOLADOS

A detecção da atividade celulolítica foi realizada para os 50 isolados e todos produziram FPases e CMCases em fermentação submersa, contendo meio sais minerais e papel filtro (FP) como única fonte de carbono, em todos os 7 dias de fermentação. No entanto, é importante lembrar que a quantificação de atividade celulolítica por estes fungos não garante que os mesmos estejam decompondo a celulose no solo com a mesma eficiência obtida em laboratório, mas, que apresentam a habilidade de produzir celulase em ambiente rico em celulose.

### 6.2.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE CELULASE TOTAL - FPase

Após a verificação da atividade enzimática para os diferentes isolados foi constatado que 44% destes apresentaram atividade enzimática de celulase total (FPase) maior que 100 U.L<sup>-1</sup>. Os isolados IS-17 (*Aspergillus*), IS- 5 e IS-2 (*Trichoderma*) obtiveram os melhores resultados (880, 870 e 760 U.L<sup>-1</sup>, respectivamente), conforme descrito na figura 8. A maioria dos isolados testados apresentou atividade FPase máxima no sétimo dia de fermentação.



**Figura 8:** Isolados que apresentaram atividade FPase maior que 100 U.L<sup>-1</sup> em diferentes tempos de fermentação.

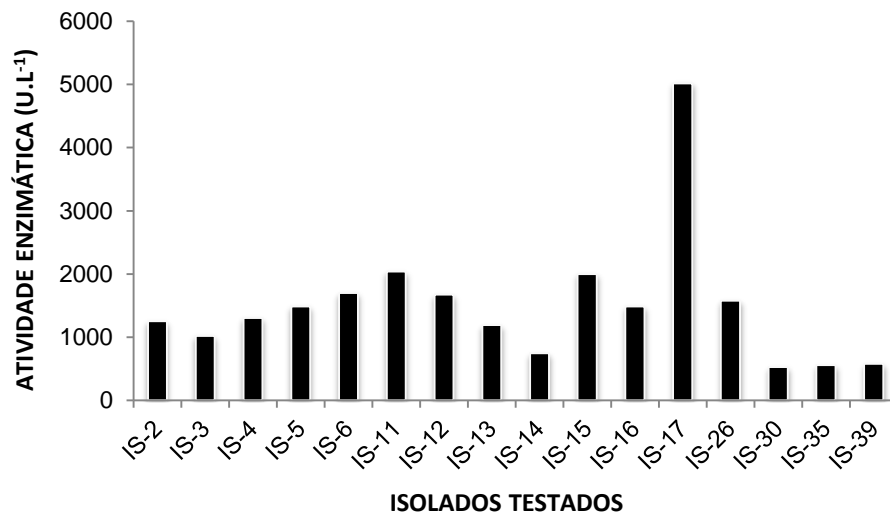
Em um estudo, Andrade (2010) verificou que fungos isolados da Restinga de Guaibim apresentam baixa atividade de FPase em fermentação submersa, contendo papel filtro como única fonte de carbono. Este estudo revelou ainda que os fungos isolados da região de moita e entre moita que apresentaram melhores valores de atividade celulásica pertenciam aos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus*, resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho.

Os gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* estão entre os gêneros de fungos celulolíticos mais estudados e suas enzimas estão entre as mais utilizadas na indústria (AGUIAR e MENEZES, 2000; RABELO, 2007).

De acordo com Ahamed e Vermette (2008), os níveis máximos de atividade de celulase total foram obtidos pelo fungo *Trichoderma reesei* RUT-C30 (entre 1.500 e 4.500 U.L<sup>-1</sup>), uma estirpe modificada geneticamente considerada altamente produtora de celulases, com valores estes superiores ao apresentado neste estudo. Em condições otimizadas, o fungo *T. reesei* RUT-C30 pode produzir valores de FPase superiores a 5.000 U.L<sup>-1</sup>. Liming e Xueliang (2004), otimizaram as condições e observaram um máximo de atividade de FPase (5.250 U.L<sup>-1</sup>) produzido pelo fungo *T. reesei* ZU-02 crescendo em sabugo de milho como fonte de carbono.

### 6.2.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENDOGLUCANASE – CMC<sub>Case</sub>

A atividade enzimática de endoglucanase mostrou valores maiores que a atividade de celulase total, indicando que os fungos testados são melhores produtores de endoglucanases. Mais de 32% dos isolados testados apresentaram atividade de CMC<sub>Case</sub> maior que 500 U.L<sup>-1</sup> (Figura 9). Novamente, o isolado IS-17 (*Aspergillus*) apresentou maior valor de atividade enzimática (5.016 U.L<sup>-1</sup>), seguido pelos isolados IS- 11 (*Trichoderma*), IS- 15 (*Penicillium*) e IS- 6 (*Penicillium*), com 2.039, 2.003 e 1.701 U.L<sup>-1</sup>, respectivamente, após o sétimo dia de fermentação.



**Figura 9:** Isolados que apresentaram atividade de CMCase maior que 500 U.L<sup>-1</sup> em diferentes tempos de fermentação.

Segundo Rocha (2010), as maiores temperaturas favoreceram uma maior produção enzimática de celulase por *Aspergillus niger* utilizando resíduo de arroz. Grigorevski-Lima et al. (2009), observaram uma produção de CMCase de 120 U.L<sup>-1</sup> e 180 U.L<sup>-1</sup> para a estirpe *Aspergillus fumigatus* em farelo de trigo e bagaço de cana, respectivamente, após 4 dias de fermentação.

Como o isolado *Aspergillus* sp. IS-17 apresentou melhores atividades de FPase e CMCase, este foi selecionado para produção de celulases, utilizando o bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio.

### 6.3 PRODUÇÃO DE CELULASES UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA E MILHOCINA

Os ensaios analíticos do *screening* para atividades de CMCase e FPase revelaram que os melhores resultados foram obtido no terceiro dia de fermentação, para as duas enzimas estudadas. É interessante para os processos industriais a redução do tempo para produção de enzimas, pois, isto representa um aumento no rendimento dos processos aplicados.

Para CMCase e FPase a melhor condição foi a apresentada no ensaio 9, quando utilizou-se 0,164g (0,16% p/v) da concentração da fonte de carbono, 0,2g (1% p/v) de

concentração da fonte de nitrogênio e 30 $\mu$ L de volume do inoculo, alcançando atividade de 2.390 U.L<sup>-1</sup> e 334 U.L<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 9).

**Tabela 9** - Matriz do delineamento composto central rotacional (valores reais), com resultados observados e preditos para produção de CMCase e FPase por *Aspergillus* sp. IS-17.

Ensaio	Valores Reais			Atividade de CMCase (U.L <sup>-1</sup> )		Atividade de FPase (U.L <sup>-1</sup> )	
	Bagaço de Cana (g)	Milhocina (g)	Inoculo ( $\mu$ L)	Observado	Predito	Observado	Predito
1	1,5	0,5	20	2283	2112	278	264
2	3,5	0,5	20	1592	1669	224	180
3	1,5	1,5	20	2188	2307	300	264
4	3,5	1,5	20	1961	1911	258	180
5	1,5	0,5	40	1886	1932	252	264
6	0,7	0,1	40	2049	1926	206	180
7	0,3	0,3	40	2339	2258	218	264
8	0,7	0,3	40	2132	2298	208	180
9	0,164	0,2	30	2390	2439	334	292
10	0,836	0,2	30	2144	2101	87	152
11	0,5	0,032	30	1497	1597	169	222
12	0,5	0,368	30	2168	2074	212	222
13	0,5	0,2	13,2	1894	1907	185	222
14	0,5	0,2	46,8	2088	2081	234	222
15 (C)	0,5	0,2	30	1700	1729	197	222
16 (C)	0,5	0,2	30	1747	1729	208	222
17 (C)	0,5	0,2	30	1740	1729	204	222

O coeficiente de determinação obtido ( $R^2 = 88\%$ ) e o teste F para liberação de açúcares redutores foram válidos a 95% de confiança (Tabela 10). De acordo com os dados experimentais ajustados pela ANOVA foram considerados significativos os termos quadrático e linear de bagaço de cana e linear de milhocina com  $p$ -valores menores que 0,05 (5%). Vale ressaltar que o termo quadrático do volume de inoculo apresentou um  $p$ -valor próximo a 0,05 sendo, portanto, considerado significativo.

**Tabela 10** - Estimativa dos efeitos para a Atividade CMC<sub>Case</sub> de *Aspergillus* sp. IS-17.

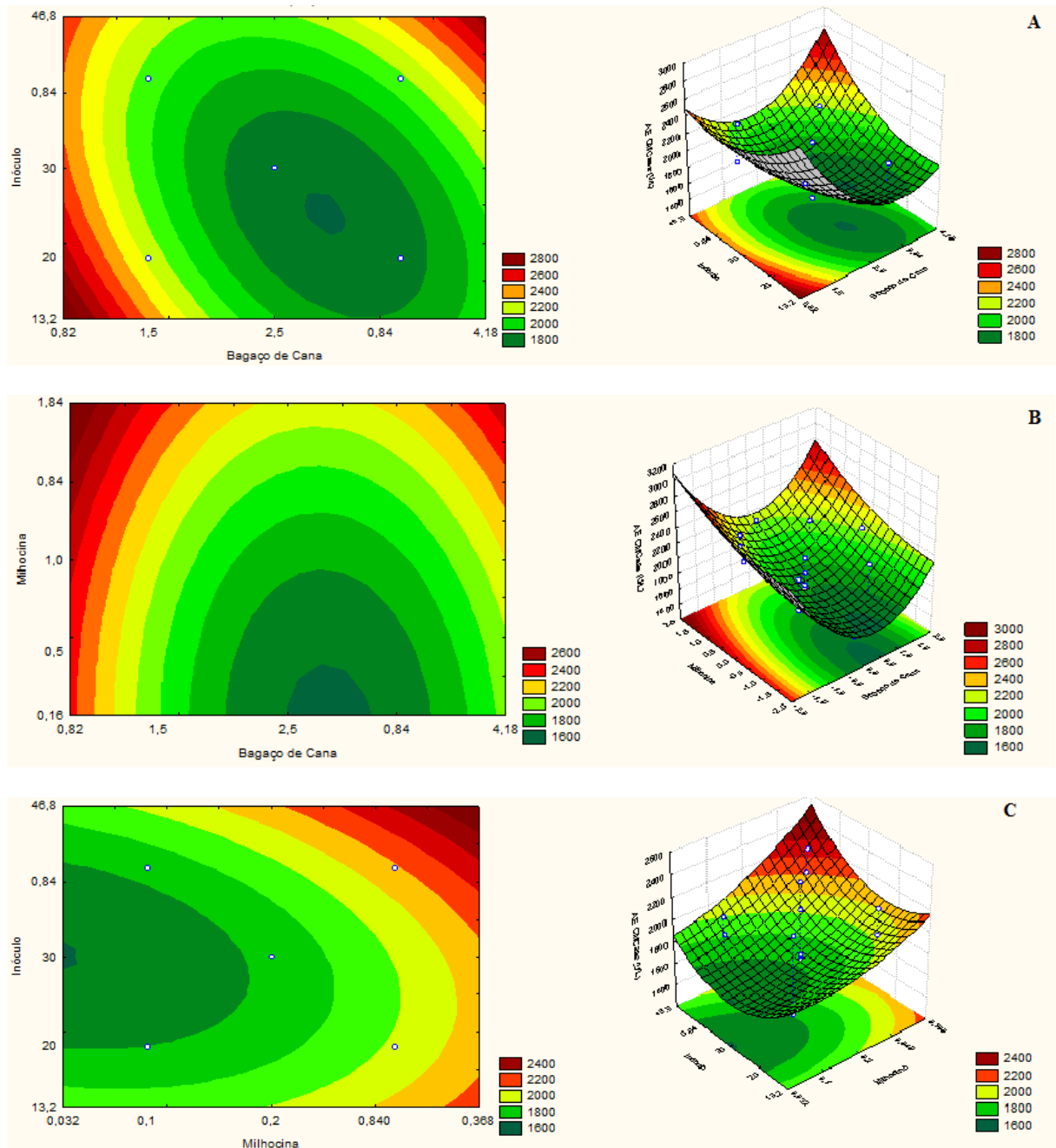
Fatores	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	t (7)	p - valor	Estimativas por Intervalo (95%)	
					Limite Inferior	Limite Superior
<b>Média</b>	1728,657	77,91410	22,18671	0,000000	1544,420	1912,895
<b>Bagaço de cana (L)</b>	-100,735	36,58912	-2,75314	0,028375	-187,254	-14,215
<b>Bagaço de cana (Q)</b>	191,392	40,27166	4,75251	0,002077	96,164	286,619
<b>Milhocina (L)</b>	141,942	36,58912	3,87935	0,006058	55,423	228,462
<b>Milhocina (Q)</b>	37,773	40,27166	0,93795	0,379498	-57,455	133,000
<b>Inoculo (L)</b>	51,862	36,58912	1,41741	0,199302	-34,658	138,381
<b>Inoculo (Q)</b>	93,811	40,27166	2,32945	0,052657	-1,417	189,038

O modelo codificado para liberação de açúcares redutores produzidos durante a atividade de CMC<sub>Case</sub> foi validado pela ANOVA, com o F calculado superior ao F tabelado (Tabela 11).

**Tabela 11** - ANOVA para os resultados do planejamento DCCR 2<sup>3</sup>, referente à atividade de CMC<sub>Case</sub> no terceiro dia de fermentação, utilizando bagaço de cana e Milhocina.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F <sub>cal</sub>	F <sub>tab</sub>
<b>Regressão</b>	1121816	2	560908	12,1	4,46
<b>Resíduos</b>	370346	8	46293		
<b>Total</b>	1492162	10	607201		

Após a validação do modelo, foi gerada a curva de contorno e superfície de resposta para uma melhor visualização dos efeitos das variáveis sobre a atividade enzimática. As análises de superfície de resposta e curvas de contorno geradas indicaram que para variável fonte de carbono a faixa ótima foi observada entre 0,82 e 1,5%, para fonte de nitrogênio entre 0,5 a 1,5% e para variável volume do inoculo entre 30 e 40µL (Figura 10).



**Figura 10:** Curva de contorno e Superfície de Resposta para atividade de CMCase em função da concentração de fonte de carbono e volume do inoculo (A); em função da concentração de fonte de carbono e nitrogênio (B) e em função da concentração de fonte de nitrogênio e volume do inoculo (C).

O modelo codificado para liberação de açúcares redutores produzidos durante a atividade de FPase não foi estatisticamente significativo como mostrado pela ANOVA (Tabela 12). E, portanto, não foram gerados os gráficos de superfície de resposta e curva de contorno. Um novo planejamento com diferentes concentrações e volumes das variáveis analisadas poderá ser realizado, no intuito de desenvolver um modelo válido.

**Tabela 12** - ANOVA para os resultados do planejamento DCCR 2<sup>3</sup>, referente à atividade de FPase no terceiro dia de fermentação, utilizando bagaço de cana e Milhocina.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F <sub>cal</sub>	F <sub>tab</sub>
Regressão	47349	5	560908	1,4	3,20
Resíduos	72228	11	46293		
Total	119577	16	16036		

## 6.4 OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO

A otimização do meio de fermentação foi realizada a fim de aumentar a produção de celulasas e baratear os custos da produção da enzima estudada. Os ensaios analíticos de otimização da produção de CMC<sub>Case</sub> evidenciou a influência da concentração da fonte de nitrogênio para aumentar a atividade. A melhor atividade observada (2.945 U.L<sup>-1</sup>) ocorreu sob as condições de maior concentração de milhocina 0,44g (2,2% p/v) e a 40 µL de volume do inoculo (Tabela 13). Os resultados obtidos nestes novos ensaios representaram um aumento de 23% na atividade enzimática.

**Tabela 13** - Matriz do delineamento composto central rotacional (valores reais), com resultados observados e preditos da otimização, para produção de CMC<sub>Case</sub> por *Aspergillus* sp. IS-17.

Ensaio	Valores Reais		Atividade CMC <sub>Case</sub> (U.L <sup>-1</sup> )	
	Milhocina (g)	Inóculo (µL)	Observado	Predito
1	0,2	30	1999	2096
2	0,4	30	2662	2675
3	0,2	50	2477	2541
4	0,4	50	2671	2653
5	0,16	40	2691	2629
6	0,44	40	2945	2928
7	0,3	25,9	2057	1959
8	0,3	54,1	2428	2448
9(C)	0,3	40	2633	2632
10 (C)	0,3	40	2623	2632
11 (C)	0,3	40	2642	2632



O coeficiente de determinação obtido ( $R^2 = 96\%$ ) e o teste F para liberação de açúcares redutores foram válidos a 95% de confiança (Tabela 14). De acordo com os dados experimentais ajustados pela ANOVA foram considerados significativos os termos quadrático e linear de volume do inoculo e linear de milhocina com  $p$ -valores menores que 0,05 (5%).

**Tabela 14** - Estimativa dos efeitos para a Atividade CMC<sub>Case</sub> de *Aspergillus* sp. IS-17.

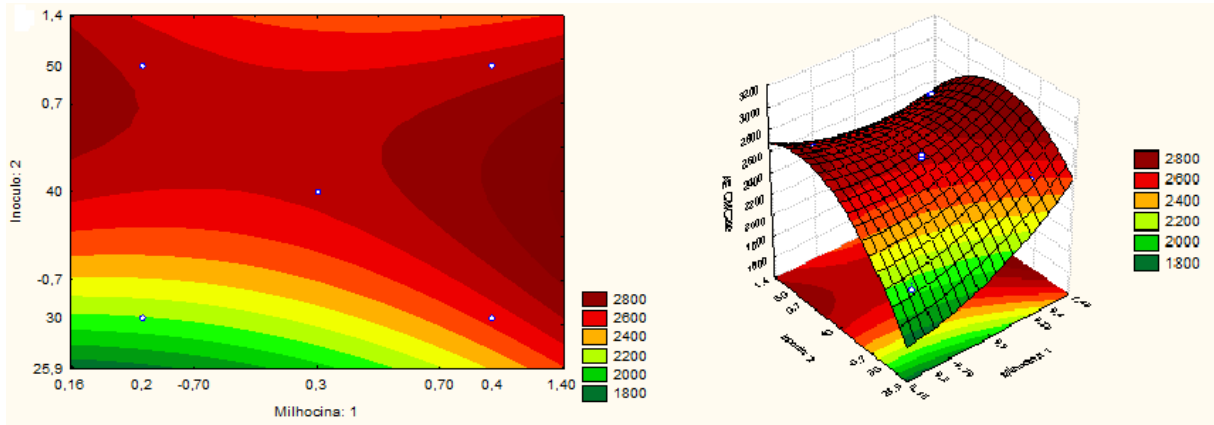
Fatores	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	t(5)	p - valor	Estimativas por Intervalo (95%)	
					Limite Inferior	Limite Superior
<b>Média</b>	2632,333	43,49398	60,52179	0,000000	2520,528	2744,138
<b>Milhocina (L)</b>	105,750	26,63451	3,97043	0,010632	37,284	174,217
<b>Milhocina (Q)</b>	73,208	31,70141	2,30931	0,068967	-8,283	154,699
<b>Inoculo (L)</b>	172,746	26,63451	6,48579	0,001300	104,280	241,212
<b>Inoculo (Q)</b>	-214,417	31,70141	-6,76363	0,001073	-295,908	-132,926

O modelo codificado para liberação de açúcares redutores foi validado pela ANOVA, com F calculado muito superior ao F tabelado (Tabela 15).

**Tabela 15** - ANOVA para otimização da atividade CMC<sub>Case</sub> produzida por *Aspergillus* sp. IS-17, no terceiro dia de fermentação, utilizando bagaço de cana e milhocina.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F <sub>cal</sub>	F <sub>tab</sub>
<b>Regressão</b>	784142	2	7330	53,4	4,46
<b>Resíduos</b>	58641	8	392071		
<b>Total</b>	842783	10	399401		

A avaliação da superfície de resposta e da curva de contorno evidencia os efeitos das variáveis na atividade CMC<sub>Case</sub> e sugere um aumento na concentração da fonte de nitrogênio e fixação do volume do inoculo em 40  $\mu$ L para obtenção da maximização da atividade enzimática e, conseqüentemente, para validação do modelo aplicado (Figura 11).



**Figura 11:** Curva de contorno e Superfície de resposta para a atividade CMCase em função da milhocina e da concentração de inóculo, após 3 dias de fermentação.

Assim, para validação da atividade CMCase foram mantidas as mesmas condições da otimização e seguiram-se as indicações fornecidas pelo programa. Os resultados dos ensaios estão sintetizados na tabela 16, onde observou-se um valor máximo de atividade de CMCase ( $3.518 \text{ U.L}^{-1}$ ) com 2,3% (p/v) de milhocina. Com base nestes resultados foi possível selecionar o extrato enzimático obtido do ensaio 2 para determinação do perfil ótimo de temperatura e pH.

**Tabela 16** - Resultados da validação da atividade de CMCase, obtida por *Aspergillus* sp. IS-17.

Ensaio	Concentração da fonte de N (%)	Atividade Enzimática ( $\text{U.L}^{-1}$ )
1	2,2	2685
2	2,3	3518
3	2,4	3490
4	2,5	1914

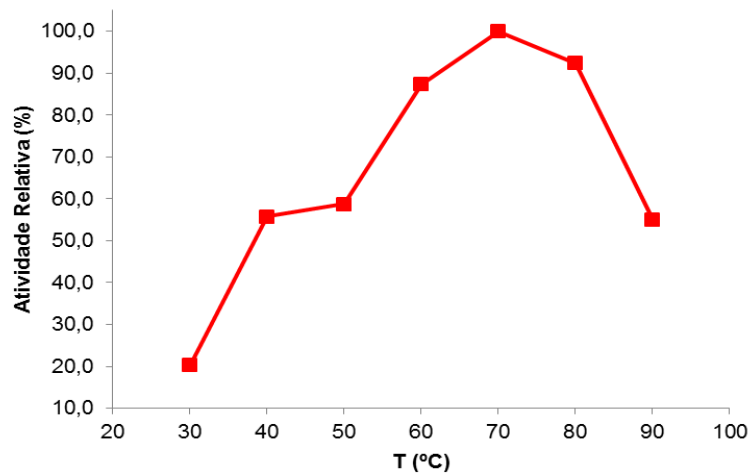
Sukumaram et al. (2005) avaliaram a produção de celulase por *Aspergillus niger* utilizando farelo de trigo em 72 horas de processo e com adição de nutrientes (peptona, extrato de levedura, uréia, sais de fósforo e de magnésio e oligoelementos) obtiveram atividade de  $4,55 \text{ U.g}^{-1}$ . Rocha (2010), utilizando casca de maracujá, encontrou atividade  $5,98 \text{ U.g}^{-1}$  para produção de celulase por *Aspergillus niger*.

Maeda (2010), avaliando a produção de celulase por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa utilizando bagaço de cana, uréia e extrato de levedura como substrato, encontrou atividade enzimática CMCase de  $7.100 \text{ U.L}^{-1}$ . Martins et al. (2008) avaliaram a produção de celulases por *Penicillium echinulatum* em diversos substratos e obtiveram

valores de atividade CMCásica de  $1.530 \text{ U.L}^{-1}$  ao final de 192 h de fermentação. Os resultados demonstram a influência da utilização das diferentes fontes de carbono e nitrogênio, bem como o comportamento dos micro-organismos frente às diferentes condições oferecidas.

## 6.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL ÓTIMO DE TEMPERATURA

O estudo de perfil de temperatura da enzima produzida por *Aspergillus* sp. IS-17 revelou que na faixa de 50 a 80°C a enzima mantém atividade relativa acima de 50%, com ótimo de atividade obtida em 70°C. Temperaturas menores que 50°C ou maiores que 80°C representam uma queda significativa na atividade relativa da enzima (Figura 12).



**Figura 12:** Efeito da temperatura na atividade CMCase produzida por *Aspergillus* sp. IS-17, expressa em atividade relativa.

A maior parte das CMCases descritas na literatura apresenta atividade máxima em torno dos 50°C. Naika, Kaul e Prakash (2007) encontrou 40°C como a temperatura ótima da endoglucanase produzida por *Aspergillus aculeatus*. Estudos utilizando *Aspergillus niger* têm demonstrado uma atividade residual de cerca de 100% para a atividade da celulase em temperaturas entre 50 e 60°C (AGUIAR, 2001).

A caracterização enzimática de CMCase produzida pelo fungo *Trichoderma atroviride* 676 mostrou uma faixa de temperatura próxima a do *Aspergillus* sp. IS-17, entre 50 e 70°C, com atividade máxima a 60°C (GRIGOREVSKI-LIMA, 2009). Sul et al. (2004) observou

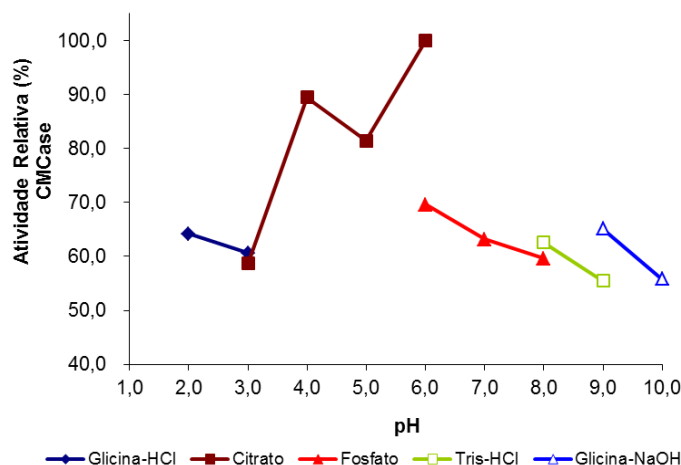
uma faixa ótima de atividade enzimática de endoglucanase produzida por *Trichoderma* sp. C-4 entre 40 e 60°C. Ferreira (2011) relata que *Penicillium* sp. IS-07 e *Trichoderma reesei* RUT C30 produzem uma endoglucanase com 100% de atividade à 60°C. A literatura descreve ainda duas endoglucanases produzidas pelo fungo termofílico *Melanocarpus* sp. MTCC 3922, que possuem atividade ótima entre 50 e 70°C (KAUR et al., 2007).

Oliveira (2010) obteve valores máximos para produção de celulases por *Aspergillus niger* NRRL 2001, ao utilizar a temperatura de 60°C. Fonteles et al. (2009), constataram através de análise de superfície de resposta condições ótimas de temperatura a 61°C ao realizar trabalhos com *Trichoderma polysporum*.

Enzimas que são estáveis acima de 50°C, como a encontrada neste estudo, é um dos desafios apontados por Bon et al. (2008) para aumentar a velocidade de hidrólise da biomassa vegetal na produção de bioetanol de segunda geração.

## 6.6 DETERMINAÇÃO DO PERFIL ÓTIMO DE pH

Com relação ao perfil de pH, a enzima manteve sua atividade relativa acima de 50% em todas as faixas de pH e tampões avaliados. Contudo, em pH 6,0 e tampão citrato de sódio ela obteve sua maior atividade relativa, conforme o gráfico da figura 13.



**Figura 13:** Efeito do pH na atividade CMCase produzida por *Aspergillus* sp. IS-17, expressa em atividade relativa.

Em geral, na literatura são encontrados relatos de ótimo de pH para CMCases na faixa de 3,0 a 5,0. Espécies de *Trichoderma* apresentam um ótimo de atividade nesta faixa, diferente dos resultados obtidos neste trabalho (GRIGOREVSKI-LIMA, 2009; SUL et al., 2004). Um estudo comparando a atividade de CMCCase do fungo *Penicillium* sp. IS-07 e *Trichoderma reesei* RUT C30 mostrou que em pH 5,0 e 7,0, respectivamente, estes isolados obtiveram sua atividade máxima (FERREIRA, 2011).

É conhecido na literatura que espécies de *Aspergillus* são capazes de produzir endoglucanases acidófilas, com máximo de atividade em pH 2,0 (GRIGOREVSKI-LIMA et al., 2009). Esses dados, somados aos obtidos neste estudo, demonstram uma versatilidade enzimática dentro do gênero.

Uma enzima que atue em diferentes faixas de pH sem diminuir significativamente sua atividade é importante para aplicações industriais, pois, elimina a necessidade de controlar o pH nas diferentes etapas do processo aplicado, reduzindo os custos da produção.

## 6. CONCLUSÕES

O presente estudo revelou que:

1. Houve uma predominância dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma* na comunidade de fungos celulolíticos de formação arbustiva fechada da restinga de Guaibim;
2. Os fungos isolados da Restinga apresentaram grande potencial biotecnológico, pois, produziram bons níveis de celulases, enzimas aplicadas em diversas indústrias;
3. O delineamento composto central rotacional aqui proposto foi um modelo válido para testar a produção de CMCases, porém, não foi adequado para produção de FPases, sendo necessário que se construa um novo modelo para produção e estudo destas enzimas;

4. O fungo *Aspergillus* sp. IS-17 produziu bons níveis de CMCase utilizando bagaço de cana como única fonte de carbono e milhocina sólida como fonte de nitrogênio;

5. Embora sua concentração no meio de cultivo não tenha apresentado influência significativa para elevação da atividade enzimática de CMCase, o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* mostrou-se um relevante indutor na produção de celulasas por *Aspergillus* sp. IS-17 e, devido ao seu baixo custo, pode ser empregado industrialmente diminuindo os custos de produção destas enzimas;

6. A milhocina sólida e o volume do inóculo foram variáveis importantes na produção de celulasas em fermentação submersa, contribuindo significativamente para otimização da produção de CMCase;

7. A caracterização, quanto ao perfil de temperatura, mostrou 70°C como a temperatura ideal para a maximização da atividade de CMCase, entretanto, esta enzima mantém sua atividade em níveis razoáveis na faixa de 50° a 80°C;

8. O perfil de pH revelou uma estabilidade na atividade relativa de CMCase em todas as faixas de pH avaliadas, porém, a enzima atinge seu ótimo de atuação em pH 6,0 e tampão citrato de sódio;

9. A restinga é um importante reservatório de fungos com elevado potencial biotecnológico que podem ser aplicados em diversos processos industriais; no entanto, novos e detalhados estudos deverão ser conduzidos a fim de verificar a viabilidade econômica destes processos e minudenciar a atuação das enzimas, bem como caracterizar o resíduo utilizado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, C. L. Biodegradation of the cellulose from sugar cane bagasse by fungal cellulase. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 3, p. 117–121, 2001.
- AGUIAR, C. L. e MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim Centro de Pesquisas de Processamento de Alimentos**, v. 18, p. 57-70, 2000.
- AHAMED, A. e VERMETTE, P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 399-407, 2008.
- AINSWORTH, G. C. Introduction to the History of Mycology (Cambridge: Cambridge University Press), 1976.
- ALBERTASSE, P. D.; THOMAZ, L. D. e ANDRADE, M. A. Plantas medicinais e seus usos na comunidade da Barra do Jucu, Vila Velha, ES. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.12, n.3, p.250-260, 2010.
- ALBERTONI, E. F. e ESTEVES, F. A. Larvae and post-larvae of Penaeidae and Palaemonidae in costal lagoons of the north of Rio de Janeiro (Macaé-RJ). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 59, n. 1, p.109-117, 1999.
- ALEXOPOULOS, C.; MIMS, C. W. e BLACKWELL, M. Introductory mycology. John Wiley; Sons, New York, p.896, 1996. In: ESPOSITO, E. e AZEVEDO, J. L. **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias: EDUCS, 2 ed., p.48-85, 2010.
- ALMEIDA JR, E. B.; OLIVO, M. A.; ARAÚJO, E. L. e ZICKEL, C. S. Caracterização da vegetação de restinga da RPPN de Maracaípe, PE, Brasil, com base na fisionomia, flora, nutrientes do solo e lençol freático. **Acta Botânica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 36-48, 2009.
- ANDRADE, J. P. Comunidade de fungos filamentosos celulolíticos da restinga de Guaibim – Bahia e seu potencial biotecnológico. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas (BA), 2010.
- ANDRADE-LIMA, D. Estudos fitogeográficos de Pernambuco. **Instituto de Pesquisa Agrônômica de Pernambuco**, Recife, v. 2, 1960. In: ALMEIDA JR, E. B.; OLIVO, M. A.; ARAÚJO, E. L. e ZICKEL, C. S. Caracterização da vegetação de restinga da RPPN de Maracaípe, PE, Brasil, com base na fisionomia, flora, nutrientes do solo e lençol freático. **Acta Botânica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 36-48, 2009.
- ÂNGELO, R. S. Enzimas hidrolíticas. In: AZEVEDO, J. L. e ESPOSITO, E. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2 ed., p. 173-212, 2010.
- ARANTES, V. e SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 4, 2010.

Disponível em: [www.biotechnologyforbiofuels.com/content/3/1/4](http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/3/1/4). Acesso em outubro de 2010.

ARAÚJO, D. S. D. Vegetation types of sandy coastal plains of tropical Brazil: a first approximation. In: COASTAL PLANT COMMUNITIES OF LATIN AMERICA, 1992, New York. **Anais...**, Academic Press, New York, p. 337-347. 1992. In: ASSIS, A. M.; PEREIRA, O. J. e THOMAZ, L. D. Fitossociologia de uma floresta de restinga no Parque Estadual Paulo César Vinha, Setiba, município de Guarapari (ES). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 349-361, 2004.

ARAÚJO, D. S. D. Restingas: Síntese dos conhecimentos para a costa sul-sudeste brasileira. In: I SIMPÓSIO SOBRE ECOSISTEMAS DA COSTA SUL E SUDESTE BRASILEIRA, 1987, São Paulo. **Anais...** São Paulo, p. 333-347, 1987. In: ASSIS, A. M.; PEREIRA, O. J. e THOMAZ, L. D. Fitossociologia de uma floresta de restinga no Parque Estadual Paulo César Vinha, Setiba, município de Guarapari (ES). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 349-361, 2004.

ARAÚJO, D. S. D. e HENRIQUES, R. P. B. Análise florística das restingas do Estado do Rio de Janeiro, p.159-193, 1984. In: FREIRE, E. M. X. Estudo Ecológico e Zoogeográfico Sobre a Fauna de Lagartos (Sauria) das Dunas de Natal, Rio Grande do Norte e da Restinga de Ponta de Campina, Cabedelo, Paraíba, Brasil. **Revista brasileira de Zoologia**, v.13, n. 4, p. 903 – 921, 1996.

ARAÚJO, D. S. D. e LACERDA, L. D. A natureza das restingas. **Ciência Hoje**, v. 6, n.33, p.42-48, 1987. In: SANTOS et. al. Análise florística das pteridófitas do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v.18, p. 271, 2004.

ARAÚJO, D. S. D. e OLIVEIRA, R. R. Reserva Biológica Estadual da Praia do Sul. (Ilha Grande, Estado do Rio de Janeiro). Lista preliminar da flora. **Acta Botânica Brasilica**, v. 1, n. 2, p. 83-94, 1988. In: MONTEZUMA, R. C. M. e ARAÚJO, D. S. D. Estrutura da Vegetação de uma Restinga Arbustiva Inundável no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio De Janeiro. **Pesquisas, Botânica: Instituto Anchieta de Pesquisas**, São Leopoldo, n. 58, p. 157-176, 2007.

ASSIS, A. M.; PEREIRA, O. J. e THOMAZ, L. D. Fitossociologia de uma floresta de restinga no Parque Estadual Paulo César Vinha, Setiba, município de Guarapari (ES). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 349-361, 2004.

ATLAS, R. M. e BARTHA R. **Microbial Ecology – Fundamentals and Applications**. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 3 ed., 1993.

AUER, C. G.; GUIZELINI, A. M.; PIMENTEL, I. C. e BIZI, R. M. Fungos em Acículas da Serapilheira de *Pinus taeda* L. em Povoamentos com Diferentes Idades. **Floresta**, Curitiba, PR, v. 36, n. 3, p. 433-438, 2006.

AVELAR, W. E. P.; BUENO-GALVÃO, M.S.; GIULIETTI, A.M. e FILHO, E.R. Em busca do conhecimento ecológico. São Paulo: Edgard Blücher, 1995. In: DANIEL, R. B. Florística e



Fitossociologia da Restinga Herbáceo-Arbustiva do Morro dos Conventos, Araranguá, SC. Dissertação de mestrado, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma (SC), 2006.

AWAFO, V.A. **Biosynthesis of cellulase-system from *Trichoderma reesei* and its characteristics.** Tese de Doutorado, Departamento de Ciência de Alimentos e Química Agrícola, McGill University, Canadá, 1997.

AZEVEDO, J. L. Genética dos fungos. In: AZEVEDO, J. L. e ESPOSITO, E. Fungos: **uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** Caxias do Sul: EDUCS, 2 ed., p. 173-212, 2010.

BAILEY, A. J. e JEGER, J. M. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. Oxford: **British Society for Plant Pathology**, 1992.

BARNETT, H. L. e HUNTER, B. B. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi.** Minneapolis, ed. 14, 1999.

BASTOS, M. N. C. Caracterização das formações vegetais da restinga da Princesa, Ilha de Algodal - Pará. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Pará, Belém (PA), 1996. In: ASSIS, A. M.; PEREIRA, O. J. e THOMAZ, L. D. Fitossociologia de uma floresta de restinga no Parque Estadual Paulo César Vinha, Setiba, município de Guarapari (ES). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 349-361, 2004.

BAYER, E. A. e LAMED, R. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? **Biodegradation**, v. 3, p. 171-188, 1992.

BEGUIN, P. e AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Review**, v. 13, p.25-58,1994.

BELGHITH, H.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S. e GARGOURI, A. Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Pol6) cellulases. **Journal of Biotechnology**, p. 257-262, 2001.

BENNET J. W. An Overview of the Genus *Aspergillus*, 2010. Disponível em: <http://www.open-access-biology.com/aspergillus/aspergillusch1.pdf>. Acesso em setembro de 2011.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, p. 355-383, 2000.

BHAT, M. K. e BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential Industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 583-620, 1997.

BIANCHI, M. L. Polpação de palha de milho utilizando-se diferentes processos organosolventes. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), 1995.

BISARIA, V. S. e GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulosic materials: Substrats, microorganisms, enzyme and products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, p. 90-104, 1981.

BILLS, G. F. e POLISHOOK, E. Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. **Mycologia**, v. 86, p. 187-198, 1994.

BOLLÓK, M. e RÉCZEY, K. Cellulase enzyme production by various fungal strains on different carbon sources. **Acta Alimentaria**, v. 29, n.2, p. 155-168, 2000.

BON, E. P. S.; GIRIO, F. e PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**, p. 241- 271, 2008.

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A. e SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**, Edgard Blücher Ltda: São Paulo, v. 2, 2001.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução n. 417, de 23 de novembro de 2009. Dispõe sobre parâmetros básicos para definição de vegetação primária e dos estágios sucessionais secundários da vegetação de Restinga na Mata Atlântica e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 de novembro de 2009.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução n. 303, de 20 de março de 2002. Dispõe sobre parâmetros, definições e limites de Áreas de Preservação Permanente. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 13 de maio de 2002.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução n. 261, de 30 de junho de 1999. Aprova como parâmetro básico para análise dos estágios sucessionais da vegetação de Restinga para o Estado de Santa Catarina. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Florianópolis, SC, 2 de agosto de 1999.

BRASIL. Lei Nº 4.771, de 15 de Setembro de 1965. Institui o Novo Código Florestal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 de setembro de 1965.

CANTARELLA, M.; ALFANI, F.; CANTARELLA, L.; GALLIFUOCO, A. e SAPOROSI, A. Biosaccharification of cellulosic biomass in immiscible solvent-water mixtures. **Journal of Molecular Catalysis**, p. 867-875, 2001.

CAI, J. Y.; CHAPMAN, S. J.; BUSWELL, J. A. e CHANG, S. T. Production and distribution of endoglucanase, cellobiohydrolase, and  $\alpha$ -glucosidase components of the cellulolytic system of *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 553-559, 1999.

CAO, Y. e TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1291-1296, 2002.

CARDOSO, E. J. B. N. Ecologia microbiana do solo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S.M. e NEVES, M. C. P. **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.33-39, 1992.

CARLILE, M. e WATKINSON, S. C. The fungi. Academic Press, Londres, p. 48, 1987. In: ESPOSITO, E. e AZEVEDO, J. L. **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias: EDUCS, 2 ed., p.48-85, 2010.

CARRASCO, F. Thermo-mechano-chemical pretreatment of wood in a process development unit. **Wood Science and Technology**, v. 26, p. 413-428, 1992.

CARROLL, G. C. e WICKLOW, D.T. The Fungal Community. Its Organization and Role in the Ecosystem. **Marcel Dekker**, New York. P. 563-581, 1992.

CARVALHO, M. L. A. Otimização da produção de celulases por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ), 2007.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. **Further researches**, v. 70, p. 181-184, 1967.

CASTRO, A. M. e PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CASTRO, A. M. Produção e Propriedades de Celulases de Fungos Filamentosos, Obtidas a Partir de Celuliginina de Bagaço de Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ), 2006.

CAVALCANTI, M. A. Q.; OLIVEIRA, L. G.; FERNANDES, M. J. e LIMA, D. M. Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região Xingó, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 20, n. 4, p. 831-837, 2006.

CERQUEIRA, R. Biogeografia das restingas. p. 65-76. In: ESTEVES, F. A. e LACERDA, L. D. Ecologia de Restingas e Lagoas Costeiras. Macaé, UFRJ/ NUPEM, 2000. In: ALMEIDA JR, E. B.; OLIVO, M. A.; ARAÚJO, E. L. e ZICKEL, C. S. Caracterização da vegetação de restinga da RPPN de Maracaípe, PE, Brasil, com base na fisionomia, flora, nutrientes do solo e lençol freático. **Acta Botânica Brasílica**, v. 23, n. 1, p. 36-48, 2009.

CÉSAR, O. e MONTEIRO, R. Florística e fitossociologia de uma floresta de restinga em Picinguaba (Parque Estadual da Serra do Mar), Município de Ubatuba - SP. **Naturalia**, v. 20, p. 89-105, 1995. In: ASSIS, A. M.; PEREIRA, O. J. e THOMAZ, L. D. Fitossociologia de uma floresta de restinga no Parque Estadual Paulo César Vinha, Setiba, município de Guarapari (ES). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 349-361, 2004.

CESÁRIO, L. F. e GANGLIONE, M. C. Biologia floral e fenologia Reprodutiva de *Schinus terebinthifolius Raddi* (Anacardiaceae) em Restinga do Norte Fluminense. **Acta Botânica Brasílica**, v. 22, n. 3, p. 828-833, 2008.

CESTARI, C. Conhecimento de moradores sobre frugivoria por aves em uma região urbanizada e com fragmentos de restinga no sudeste do Brasil. **Biotemas**, v. 22, n. 3, p. 221-227, 2009.

CHRISTENSEN, M.; TUTHILL, D. *Aspergillus* an overview. In: SAMSON, R.; PITT, J. (Eds.). **Advances in Penicillium and Aspergillus systematics**. New York: Plenum Press, p. 195-209, 1985.

COELHO, D. G.; SANTOS, T. M. C.; ALBUQUERQUE, L. S.; CAMPOS, V. B. e PRAZERES, S. S. Quantificação de Fungos Celulolíticos em Solos de Três Ecossistemas. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v.1, n.3, p.45-49, 2008.

COLOWICK, S. P. e KAPLAN, N. O. (eds.) Section I. General Preparative. Procedures. **Methods in Enzymology**, v. 1, p. 138-146, 1995.

CORDAZZO, C. V. e STÜRMER, S. L. Ocorrência de Fungos Micorrízicos Arbusculares em *Panicum racemosum* (P.Beauv.) Spreng (Poaceae) nas Dunas Costeiras do Extremo Sul do Brasil. **Revista Atlântica**, v. 29, n.1, p. 65-68, 2007.

CORDEIRO, L. M. C.; STOCKER-WÖRGÖTTER, E.; GORIN, P. A. J. e IACOMINI, M. Comparative studies of the polysaccharides from species of the genus Ramalina-lichenized fungi of three distinct habitats. **Phytochemistry**, v. 63, n. 8, p. 967-975, 2003.

CUNHA, C. M. e SILVA F. T. Characterization of carbohydrates present in hydrolyzate obtained from sugar cane bagasse pretreated by explosion. **Brazilian Symposium Chemistry Lignins and other Wood Componentes**, v.7, p. 221-226, 2001.

DANIEL, R. B. Florística e Fitossociologia da Restinga Herbáceo-Arbustiva do Morro dos Conventos, Araranguá, SC. Dissertação de mestrado, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma (SC), 2006.

DA SILVA, V. I. e MENEZES, C. M. Manejo de Espécies Vegetais em uma Mata de Restinga no Litoral Norte da Bahia. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 159-161, 2007.

DA VINHA, F. N. M.; NASCIMENTO, R. P.; BON, E. P. S. e COELHO, R. R. R. Produção de CMCases em Resíduos Agro-Industriais por um Fungo (FBSPE-05) Isolado de Bagaço de Cana-de-Açúcar. In: XVI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS (SINAFERM), 2007, São Paulo. **Anais...** São Paulo: UFSC, 2007.

DE PAULA, M. O.; TINOCO, I. F.F.; RODRIGUES, C. S.; SILVA, E. N. e SOUZA, C. F. Potencial a cinza do bagaço da cana-de-açúcar como material de substituição parcial de cimento Portland. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13, n.3, p.353-357, 2009.

DILLON, A. Celulases. In: SAID, S. e PIETRO, R. C. L. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 243-270, 2004.

DING, S.; GE, W. e BUSWELL, J. A. Endoglucanase I from edible straw mushroom, *Volvarella volvacea*. Purification, characterization, cloning and expression. **Euro Journal Biochemistry**, v. 268, p. 5687-5695, 2001.

EMBRAPA. Relações entre a diversidade da fauna do solo e o processo de decomposição e seus reflexos sobre a estabilidade dos ecossistemas. Documento 156. Rio de Janeiro, p. 7-8, 2002.

ESPOSITO, E. e AZEVEDO, J. L. **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias: EDUCS, 2 ed., p.48-85, 2010.

FABRIS, L. C. Composição florística e fitossociológica de uma faixa de floresta arenosa litorânea do Parque Estadual de Setiba, Município de Guarapari, ES. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro (SP), 1995. In: ASSIS, A. M.; PEREIRA, O. J. e THOMAZ, L. D. Fitossociologia de uma floresta de restinga no Parque Estadual Paulo César Vinha, Setiba, município de Guarapari (ES). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 349-361, 2004.

FALKENBERG, D. B. Aspecto da flora e da vegetação secundária da Restinga de Santa Catarina, sul do Brasil. **Insula**, n.28, p.1-30, 1999. In: DANIEL, R. B. Florística e Fitossociologia da Restinga Herbáceo-Arbustiva do Morro dos Conventos, Araranguá, SC. Dissertação de mestrado, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma (SC), 2006.

FERRAZ, A.; MENDONÇA, R.; COTRIM, A.R. e SILVA, F.T. The use of white-rot decaying as a pretreatment for organosolv delignification of *Eucalyptus grandis* wood. In: WOKSHOP ON APPLICATIONS OF BIOTECHNOLOGY IN BIOENERGY SYSTEMS, **Anais...**1994, Ottawa, Canadá.

FERRAZ, A. L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E. e AZEVEDO, J. L. **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias: EDUCS, 2 ed., p.215-242, 2010.

FERRAZ, A. L. e DURAN, N. Lignin degradation during softwood decaying by the ascomycete *Chrysonilia sitophila*. **Biodegradation**, p. 265-270, 1995. In: ESPOSITO, E. e AZEVEDO, J. L. **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias: EDUCS, 2 ed., p.215-242, 2010.

FERREIRA, M. A. Utilização de resíduos agro-industriais na produção de celulases por *Penicillium* sp. Is-7 e *Trichoderma reesei* RUT-C30 e de amilases por *Streptomyces* sp. Igar-01. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas (BA), 2011.

FONTELES, T. V. OLIVEIRA, RÊGO, S. L.; COSTA, M. G. M. e RODRIGUES, S. Celulase e enzimas correlatas produzidas por *Trichoderma polysporum* através da fermentação do bagaço de caju. In: ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DA UNIVERSIDADE DE FORTALEZA, Fortaleza. **Anais...**Fortaleza, 2009.

FREIRE, E. M. X. Estudo Ecológico e Zoogeográfico Sobre a Fauna de Lagartos (Sauria) das Dunas de Natal, Rio Grande do Norte e da Restinga de Ponta de Campina, Cabedelo, Paraíba, Brasil. **Revista brasileira de Zoologia**, v.13, n. 4, p. 903-921, 1996.

FREIRE, M. S. B. Levantamento florístico do Parque Estadual das Dunas de Natal. **Acta Botanica Brasilica**, v. 4, p. 41-59, 1990. In: ALMEIDA JR, E. B.; OLIVO, M. A.; ARAÚJO, E. L. e ZICKEL, C. S. Caracterização da vegetação de restinga da RPPN de Maracaípe, PE, Brasil, com base na fisionomia, flora, nutrientes do solo e lençol freático. **Acta Botânica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 36-48, 2009.

GÁMES, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J.; RAMÍREZ, J. A. e GARROTE, G. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of food Engineering**, v. 74, p. 78-88, 2006.

GARCÍA, I. G.; PEÑA, P. R. J.; VENCESLADA, J. L. B.; MARTÍN, A. M.; SANTOS, M. A. M. e GÓMEZ, E. R. **Process Biochemistry**, 2000. In: PASSOS, C. T.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J. e BURKERT, C. A. V. Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. isolada de um solo contaminado do sul do Brasil. **Química Nova**, v. 32, p. 950-954, 2009.

GEISER, D. M. Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. **Medical Mycology**, 2008.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1986.

GIMENEZ, M. e LOBÃO, C. S. Polinização de *Krameria bahiana* B.B. Simpson (Krameriaceae) por Abelhas (Apidae) na Restinga, BA. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 4, p. 440-445, 2006.

GOLDESTEIN, I. S. **Organic chemicals from biomass**. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 320, 1981.

GONÇALVES-ESTEVEZ, V e MENDONÇA, C. B. F. Estudo polínico em plantas de restinga do Estado do Rio de Janeiro – Clusiaceae Lindl. **Revista brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 527-536, 2001.

GONZALES, G.; LEY, R.E.; SCHMIDT, S. K.; ZOU, X. e SEASTEDT, T. R. Soil ecological interactions: comparisons between tropical and subalpine forests. **Oecologia**, v. 128, p. 549 – 556, 2001.

GOMES, D. N. F. Diversidade e Potencial Biotecnológico de Fungos Filamentosos Isolados do Manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão Dos Guararapes, Pernambuco. Tese de doutorado, Universidade de Pernambuco, Recife (PE), 2007.

GOMES, F. H.; VIDAL-TORRADO, P.; MACÍAS, F.; GHERARDI, B. e PEREZ, L. O. Solos sob Vegetação de Restinga na Ilha do Cardoso (SP). I - Caracterização E Classificação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p.1563-1580, 2007.

GOMES, J. B.; RESENDE, M.; REZENDE, S. B. e MENDONÇA, E. S. Solos de três áreas de restinga. I - caracterização e classificação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 1907-1919, 1998. In: GOMES, F. H.; VIDAL-TORRADO, P.; MACÍAS, F.; GHERARDI, B. e PEREZ, L. O. Solos sob Vegetação de Restinga na Ilha do Cardoso (SP). I - Caracterização E Classificação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p.1563-1580, 2007.

GRIGOREVSKI-LIMA, A. L. Avaliação da produção de celulasas e xilanases por fungos isolados de ambientes brasileiros. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ), 2009.

GRIGOREVSKI-LIMA A. L.; DA VINHA F. N. M.; SOUZA D. T.; BISPO A. S. R.; COELHO R. R. R.; BON E. P. S. e NASCIMENTO R. P. *Aspergillus fumigatus* Thermophilic and Acidophilic Endoglucanases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.155, p. 321-329, 2009.

GRIGOREVSKI-LIMA, A. L. NASCIMENTO, R. P.; BON, E. P. S. e COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial byproducts and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 37, p. 272–277, 2005.

GUTIERREZ-CORREA, M.; PORTAL, L.; MORENO, P. e TENDERDY, R.P. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 68, p.173-178, 1999.

HAGLER, A. N.; ROSA, C. A.; MORAIS, P. B. e MENDONÇA-HAGLER, L. C. Yeasts and coliform bacteria of water accumulated in bromeliads of mangrove and sand dune ecosystems of southeast Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 973-977, 1993.

HALLEGOUET, B. L'estuaire du Rio Paraiba. Geographie et ecologie de la Paraíba (Bresil). **Travaux et Documents de Géographie Tropicale**. Bordeaux, CEGET. v. 2, n. 50, p.438-441, 1984. In: FREIRE, E. M. X. Estudo Ecológico e Zoogeográfico Sobre a Fauna de Lagartos (Sauria) das Dunas de Natal, Rio Grande do Norte e da Restinga de Ponta de Campina, Cabedelo, Paraíba, Brasil. **Revista brasileira de Zoologia**, v.13, n. 4, p. 903 – 921, 1996.

HAWKSWORTH, D.L.; KIRK, B.C.; SUTTON, B.C. e PEGLER, D.N. Ainsworth e Bisby's dictionary of fungi. CAB International, Wallingford, 1995. In: TRUFEM, S. F. B. Diversidade no Reino Fungi: Zigomycota. Disponível em: <http://www.biota.org.br/iRead?57+livros.biota+96>. Acesso em junho de 2011.

HAWKSWORTH, D. L. The tropical fungal biota: census, pertinence, prophylaxis, and prognosis. In: ISAAC, S.; FRANKLAND J. C.; WATLING, R. e WHALLEY, A. J. S. Aspects of tropical mycology. Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 265-293, 1993.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnetude, significance, and conservation. **Mycology Reserch**, v. 95, p. 641-655, 1991.

HAY, J. D.; HENRIQUES, R. P. B. e LIMA, D. M. Quantitative comparisons of dune and fore dune vegetation in restinga ecosystems in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 41, n. 3. p. 655-662, 1981. In: MONTEZUMA, R. C. M. e ARAÚJO, D. S. D. Estrutura da Vegetação de uma Restinga Arbustiva Inundável no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio De Janeiro. **Pesquisas, Botânica**: Instituto Anchietano de Pesquisas, São Leopoldo, n. 58, p. 157-176, 2007.

HAMMOND, P. M. Species inventory. In: GROOMBRIDGE, B. Global Diversity. Chapman e Hall, London, p. 17-39, 1992.

HESELTEINE, C. W. **Biotechnology and Bioengineering**, 1972. In: CASTIGLIONI, G. L.; BERTOLIN, T. E. e COSTA, J. A. Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, v. 32, p. 292-295, 2009.

HIGUCHI, T. **Experientia**, v. 38, p. 159,1982. In: CASTRO, A. M. e PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

HOPWOOD, D. A.; BIBB, M. J.; CHATER, K. F.; KIESER, T.; BRUTON, C. J.; KIESER, H. M.; LYDIATE, J.; SMITH, C. P.; WARD, J. M. e SCHREMPF, H. Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. **The John Innes Foundation**, Norwich, p. 356,1985.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, Projeto Flora/Fauna - UE/BA - Herbário RADAMBRASIL. Flora das Restingas do Litoral Norte da Bahia, Costa dos Coqueiros e Salvador. 2004. Disponível em: <ftp://geoftp.ibge.gov.br/documentos/recursosnaturais/levantamento/florarestinga.pdf>. Acesso em junho de 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Macro desenvolvimento da zona costeira**. Rio de Janeiro: p. 60, 1996.

JAITLEY, A. K. pH optima of the fungi isolated from mangroves soils in India. **Transactions of the Mycological Society of Japan**, v. 28, p. 137 – 143, 1987.

JEFFRIES, T. W.; **Biodegradation**, v.1, p. 163, 1990. In: CASTRO, A. M. e PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

JONES, E. B. G. e ALIAS, S. A. Biodiversity of Mangrove Fungi. In: **Biodiversity of Tropical Microfungi**. University Press, Hong Kong, p. 71 – 92, 1997.

JØRGENSEN, H.; MØRKEBERG, A.; KROGH, K. B. R.; e OLSSON, L. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: Effect of substrate and evaluation of cellulose adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 42-48, 2005.

JUNIOR, A. A. C. e MAIA, L. C. Os fungos do Brasil. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro, v.1. p. 875, 2010.

JUNIOR, D. L. Métodos alternativos para aproveitamento das hemiceluloses da Madeira de eucalipto na indústria de celulose Kraft. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), 2007.

KAUR, J; CHADHA, B. S.; KUMAR, B. A. e SAINI, H. S. Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. **Bioresource Technology**, p. 74-81, 2007.

KIRK P. M.; CANNON, P. F.; DAVID, J. C. e STALPERS, J. A. **Dictionary of the Fungi**, 11th ed. Wallingford: CABI Publishing, 2008.

KIRK, T. K. e CULLEN, D. Enzimology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: ESPOSITO, E. e AZEVEDO, J. L. **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias: EDUCS, 2 ed., p.215-242, 2010.



KITAYAMA, O. Bioeletricidade: co-geração através do bagaço da cana, ampliação dos empreendimentos. In: Conbien – Congresso Brasileiro de Agrobioenergia e Simpósio Internacional de Biocombustíveis, Center Convention, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. CD-ROM. 2008.

KLICH, M. A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. **Mycologia**, v.94, p. 21-27, 2002.

KOOTSTRA, A. M. J.; BEEFTINK, H. H.; SCOTT, E. L. e SANDERS, J. P. M. Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 31, 2009. Disponível em: [www.biotechnologyforbiofuels.com/content/2/1](http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/2/1). Acesso em outubro de 2010.

KUBICEK, C. P.; MESSNER, R.; GRUBER, F.; MACH, R. L. e KUBICEK-PRANZ, E. M. The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 15, p. 90-99, 1993.

KUHAD, R. C. e SINGH, A. Lignocellulose Biotechnology: current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 151-172, 1993.

KUTER, G. A. Microfungal populations associated with the decomposition of sugar maple leaf of litter. **Mycologia**, v. 78, p.114-126, 1986.

LACAZ, C. S.; PORTO, E. e MARTINS, J. E. C. **Micologia Médica**. 6º ed. Sarvier. São Paulo – SP, p. 306, 1984.

LACERDA, L. D.; ARAÚJO, D. S. D. e MACIEL, N. C. Dry coastal ecosystems of the tropical Brazilian coast. In: VAN DER MAAREL, E. Dry Coastal Ecosystems: Africa, America, Asia and Oceania. **Elsevier**, Amsterdam, p. 477- 493, 1993. In: MONTEZUMA, R. C. M. e ARAÚJO, D. S. D. Estrutura da Vegetação de uma Restinga Arbustiva Inundável no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio De Janeiro. **Pesquisas, Botânica**: Instituto Anchietano de Pesquisas, São Leopoldo, n. 58, p. 157-176, 2007.

LACERDA, L. D. DE; ARAÚJO, D. S. D e MACIEL, N. C. Restingas brasileiras: uma bibliografia. Rio de Janeiro, Fund. José Bonifácio, p. 47, 1982. In: FREIRE, E. M. X. Estudo Ecológico e Zoogeográfico Sobre a Fauna de Lagartos (Sauria) das Dunas de Natal, Rio Grande do Norte e da Restinga de Ponta de Campina, Cabedelo, Paraíba, Brasil. **Revista brasileira de Zoologia**, v.13, n. 4, p. 903 – 921, 1996.

LACERDA; L. D. e ARAÚJO, D. S. D. A natureza das restingas. **Ciência Hoje**, v.6, n. 33, p.42-49, 1987. In: DANIEL, R. B. Florística e Fitosociologia da Restinga Herbáceo-Arbustiva do Morro dos Conventos, Araranguá, SC. Dissertação de mestrado, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma (SC), 2006.

LACERDA, L. D. e ESTEVES, F. A. Apresentação - Restingas brasileiras: Quinze anos de estudos. p. 2-7, 2000. In: ESTEVES, F. A. e LACERDA, L. D. Ecologia de restingas e lagoas costeiras. Macaé, **Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Sócio-Ambiental de Macaé-NUPEM**, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, p. 446, 2000.

LEÃO, Z. M. A. N. e DOMINGUEZ, J. M. L. Tropical coast of Brazil. **Marine Pollution Bulletin – Elsevier**, v. 41, p. 112-122, 2000. In: GOMES, F. H.; VIDAL-TORRADO, P.; MACÍAS, F.; GHERARDI, B. e PEREZ, L. O. Solos sob Vegetação de Restinga na Ilha do Cardoso (Sp). I - Caracterização E Classificação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p.1563-1580, 2007.

LEITE, L. C. Taxonomia dos fungos. In: ESPOSITO, E. e AZEVEDO, J. L. **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias: EDUCS, 2 ed., p.48-85, 2010.

LESSA, I. C. M.; RIBEIRO, T. T. L.; COSTA, D. P.; MANGOLIN, R.; ENRICE, M. C. e BERGALLO, H. G. Riqueza de Pequenos Mamíferos e Complexidade de Habitats em Restingas do Sudeste Brasileiro. In: VIII CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, Caxambu, 2007. **Anais...**, Caxambu, 2007.

LEVY, B. F. The natural history of the degradation of wood. *Phil. Trans. R. soc. London*, p. 423-433, 1987. In: ESPOSITO, E. e AZEVEDO, J. L. **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias: EDUCS, 2 ed., p.215-242, 2010.

LEWINSOHN T. M. e PRADO P. I. Síntese do conhecimento atual da biodiversidade brasileira. In: LEWINSOHN T. M. Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2006.

LIMA, B. C.; SOARES, F. e SINZATO, D. M. S. Análise Comparativa de Biodiversidade Entomológica no Ecossistema Restinga: Um Enfoque Fotográfico como Metodologia de Identificação. In: VIII CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 2007, CAXAMBU. **Anais...** Caxambu, p. 1-2, 2007.

LIMING, X. e XUELIANG, S. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 259-262, 2004.

LOBÃO, A. Q. e KURTZ, B. Fitossociologia de um trecho de mata de restinga na Praia Gordas, município de Armação de Búzios, RJ. In: V SIMPÓSIO DE ECOSSISTEMAS BRASILEIROS, 2000, São Paulo. **Anais...**, São Paulo, p.66-73, 2000. In: ASSIS, A. M.; PEREIRA, O. J. e THOMAZ, L. D. Fitossociologia de uma floresta de restinga no Parque Estadual Paulo César Vinha, Setiba, município de Guarapari (ES). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 349-361, 2004.

LOGUERCIO-LEITE, C.; GROPOSO, C.; DRESCHLER-SANTOS, E. R.; FIGUEIREDO, N. F.; GODINHO, P. S. e ABRÃO, R. L. A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares. **Biotemas**, v. 19, n. 2, p. 17-27, 2006.

LOGUERCIO-LEITE, C. Taxonomia dos fungos. In: ESPOSITO, E. e AZEVEDO, J. L. **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias: EDUCS, 2 ed., p.48-85, 2010.

LYNCH, J. M. e BRAGG, E. Microorganisms and soil aggregate stability. **Advances Soil Science**, v. 2, p. 133-171, 1985.

LYNCH, J. M.; SLATER, J. H.; BENNETT, J. A. e HARPER, S. H. T. Cellulase activities of some aerobic microorganisms isolated from soil. **Journal of General Microbiology**, v. 127, p. 231-236, 1981.

LYND, L. R. WEIMER, P., ZYL, W. H. V. e PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

LYND, L.R. e ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, n. 4, p. 467-475, 2002.

MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A. e SILVA, J. E. A. R. S. Greenhouse gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 582-595, 2008. In: SILVA, N. L. C. Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ), 2010.

MAEDA, R. N. Produção de celulasas por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa de bagaço de cana pré-tratado e sua aplicação na produção de etanol de segunda geração. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro (RJ), 2010.

MALLET-RODRIGUES, F.; ALVES, V. S.; NORONHA, M. L. M.; SERPA, G. A.; SOARES, A. B. A.; COUTO, G. S.; MACIEL, E.; MADEIRA, S. e DRAGHI, J. Aves da Baixada de Jacarepaguá, Município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 16, n. 3, p. 221-231, 2008.

MANDELS, M. e WEBER, M. The production of cellulases. In: HAJNY, G. J. e RESS, E. T. Cellulases and their applications. **American Chemical Society Advanced Series**, v. 95, p. 391-414, 1969.

MARTINS, K. V.; DIAS, E. J. R. e ROCHA, C. F. D. Ecologia e conservação do lagarto endêmico *Tropidurus hygomi* (Sauria: Tropiduridae) nas restingas do Litoral Norte da Bahia, Brasil. **Biotemas**, v. 23, n. 4, p. 71-75, 2010.

MARTINS, S. E.; ROSSI, L.; SAMPAIO, P. S. P. e MAGENDA, M. A. G. Caracterização florística de comunidades vegetais de restinga em Bertioga, SP, Brasil. **Revista brasileira de Botânica**, v. 22, n. 1, p. 249-274, 2008.

MARTINS, L. F. KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. e RAMOS, L. P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1417-1424, 2008.

MARTINS, L. F. Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR), 2005.

MARTINS, J. E. C.; MELO, N. T. e HEINS-VACCARI, E. M. **Atlas de Micologia Médica**. Ed. Manole. Barueri – SP, p. 39-45, 2005.

MASSADEH, M. I.; YUSOFF, W. M. W.; OMAR O. e KADER, J. Synergism of cellulase enzymes in mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1771-1774, 2001.

McMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL, M. E.; BAKER, J. O. e OVEREND, R. P. Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production. Washington (EUA), v. 566, p. 294-324, 1994.

MEDEIROS, D. P. W.; LOPES, A. V. e ZICKEL, C. S. Phenology of woody species in tropical coastal vegetation, northeastern Brazil. **Flora**, v. 202, p. 513-520, 2007. In: ALMEIDA JR, E. B.; OLIVO, M. A.; ARAÚJO, E. L. e ZICKEL, C. S. Caracterização da vegetação de restinga da RPPN de Maracaípe, PE, Brasil, com base na fisionomia, flora, nutrientes do solo e lençol freático. **Acta Botânica Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 36-48, 2009.

MELO, E. Levantamento de espécies de Coccoloba (Polygonaceae) da restinga do estado da Bahia, Brasil. **Sitientibus**, Feira de Santana, n. 15 p. 49-59, 1996.

MENEZES, L. F. T. e ARAÚJO, D. S. D. Estrutura de duas formações vegetais do cordão externo da restinga de Marambaia, Rio de Janeiro. **Acta Botânica Brasileira**, v. 13, p. 115-236, 1999. In: ALMEIDA JR, E. B.; OLIVO, M. A.; ARAÚJO, E. L. e ZICKEL, C. S. Caracterização da vegetação de restinga da RPPN de Maracaípe, PE, Brasil, com base na fisionomia, flora, nutrientes do solo e lençol freático. **Acta Botânica Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 36-48, 2009.

MIETTINEN-OINONEN, A.; LONDESBOROUGH, J.; JOUTSJOKI, V.; LANTTO, R. e VEHEMAANPERÄ, J. Three cellulases from *Melanocarpus albomyces* for textile treatment at neutral pH. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 332-341. 2004.

MILLER L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MONTEZUMA, R. C. M. e ARAÚJO, D. S. D. Estrutura da Vegetação de uma Restinga Arbustiva Inundável no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio De Janeiro. **Pesquisas, Botânica**: Instituto Anchieta de Pesquisas, São Leopoldo, n. 58, p. 157-176, 2007.

MORAIS, P. B.; ROSA, C. A.; HAGLER, A. N. e MENDONÇA-HAGLER, L. C. Yeasts communities of the cactus *Pilosocereus arrabidaei* as resources for larval and adult stages of *Drosophila serido*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 66, p. 313-317, 1994.

MOURA FILHO, G. Caracterização e uso de solos arenosos associados à foz do Rio São Francisco, no litoral sul de Alagoas. Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), 1998. In: GOMES, F. H.; VIDAL-TORRADO, P.; MACÍAS, F.; GHERARDI, B. e PEREZ, L. O. Solos sob Vegetação de Restinga na Ilha do Cardoso (SP). I - Caracterização E Classificação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p.1563-1580, 2007.

MUSSATTO, I. S. Influência do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz na produção de xilitol por *Candida guilliermondii*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena (SP), 2002.

NAIKA, G. S.; KAUL, P. e PRAKASH, V. Purification and Characterization of a new endoglucanase from *Aspergillus aculeatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.v. 18, p. 7566-7572, 2007.

NASCIMENTO, R. P.; COELHO, R. R. R.; MARQUES, S.; ALVES, L.; GÍRIO, F. M.; BON, E. P. S. e AMARAL-COLLAÇO, M. T. Production and partial characterisation of xilanase from *Streptomyces* sp. AMT-3 isolated from a Brazilian cerrado soil. **Enzyme Microbial and Technology**, v. 31, p. 549-555, 2002.

NASCIMENTO, R. P.; JUNIOR, N. A.; PEREIRA-JR., N.; BON, E. P. S. e COELHO R. R. R. Brewer's spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production by *Streptomyces malaysiensis*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 529-535, 2009.

NEPSTAD, D. C.; JIPP, P.; MOUTINHO, P.; NEGREIROS, G. E. e VIEIRA, S. Forest recovery following pasture abandonment in Amazonia: canopy seasonality, fire resistance and ants. NATO ASI evaluating and Monitoring the Health of Large-Scale Ecosystems. v.128, p. 333-349, 1999.

NORKRANS, B. Cellulose and cellulolysis. **Applied Microbiology**, v.9, p. 91-130,1967.

OJUMU, T. V.; SOLOMON B. O.; BETIKU E.; LAYOKUN S. K. e AMIGUN B. Cellulase production by *Aspergillus flavus* Linn Isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob. **African Journal Biotechnology**, v. 2, p.150-152, 2003.

OLIVEIRA, F. M. V. Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Lorena (SP), 2010.

OLIVEIRA, S. D.; LEMOS, J. L. S.; BARROS, C. A. e LEITE, S. G. F. Emprego de Fungos Filamentosos na Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo: Estado da Arte. Rio de Janeiro: **Série Tecnologia Ambiental 45**, CETEM/MCT, p. 1- 67, 2008.

OLIVERIO, J. L. O Processo Dhr - Dedini Hidrólise Rápida. Seminário: **Produção de álcool a partir do Bagaço**. São Paulo (SP), 2007.

ORBERG, P. K. Studies on cellulase production from annual ryegrass straw by *Trichoderma reesei*. Dissertação de mestrado, Oregon State University, Oregon, Estados Unidos da América, 1981.

PAULI, G. Upzing, How to create more income, create more jobs and eliminate pollution. **Special advanced edition for the Third World Congress on Zero Emissions**, 1997.

PEREIRA, O. J. Caracterização fitofisionômica da restinga de Setiba - Guarapari/ES. In: II SIMPÓSIO DE ECOSSISTEMAS DA COSTA SUL E SUDESTE BRASILEIRA, 1990, São Paulo. **Anais...**, São Paulo, p. 207-219, 1990. In: ASSIS, A. M.; PEREIRA, O. J. e

THOMAZ, L. D. Fitossociologia de uma floresta de restinga no Parque Estadual Paulo César Vinha, Setiba, município de Guarapari (ES). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 349-361, 2004.

PEREIRA JR., N.; COUTO, M. A. P. G. e SANTA ANNA, L. M. M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. **Series on Biotechnology**, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, p. 45, 2008.

PILÓ-VELOSO, D.; NASCIMENTO, E. A. e MORAIS, S. A. L. Isolamento e análise estrutural de ligninas. **Química Nova**, v. 16, p. 435-448, 1993.

POLACHECK, I., SALKIN, I. F., SCHENHAV, D., OFER, L.; MAGGEN, M., e HAINES, J.H. Damage to an ancient parchment document by *Aspergillus*. **Mycopathologia**, p. 89–93, 1989.

PUTZKE, J. e PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 214 p., v.2, 2002. In: OLIVEIRA, S. D.; LEMOS, J. L. S.; BARROS, C. A. e LEITE, S. G. F. Emprego de Fungos Filamentosos na Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo: Estado da Arte. Rio de Janeiro: **Série Tecnologia Ambiental 45**, CETEM/MCT, p. 1- 67, 2008.

QUEIROZ, E. P. Levantamento florístico e georeferenciamento das espécies com potencial econômico e ecológico em restinga de Mata de São João, Bahia, Brasil. **Biotemas**, v. 20, n. 4, p. 41-47, 2007.

RABELO, S. C. Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), 2007.

RABINOVICH, M. L.; MELNICK, M. S. e BOLOBOVA, A. V. The structure and mechanisms of action of cellulolytic enzymes. **Biochemistry**, Moscow, v. 65, n.8, p. 850-71, 2002.

RAJARATHNAM, S.; SHASHIREKA, M. N. e BANO, Z. Biopotentialites of the basidiomycetes. **Advances in Applied Microbiology**, v.37, p.223-361, 1992.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, p. 863-871, 2003.

RAPER K. B. e FENNELL D. I. **The genus Aspergillus**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1965.

RIZZINI, C. T. **Tratado de fitogeografia do Brasil**. 2.ed. São Paulo: Âmbito Cultural, 1997. In: DANIEL, R. B. Florística e Fitossociologia da Restinga Herbácea-Arbustiva do Morro dos Conventos, Araranguá, SC. Dissertação de mestrado, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma (SC), 2006.

ROBSON, L.M. e CHAMBLISS, G.H. Cellulases of bacterial origin. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 11, p. 626-644, 1989.

ROCHA, C. P. Otimização da Produção de enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em estado sólido. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia (MG), 2010.

ROCHA, C. F. D.; ESTEVES, F. A. e SCARANO, F. R. Pesquisa de longa duração na restinga de Jurubatiba: ecologia, história natural e conservação. Rio de Janeiro: Rima, 2004. In: DANIEL, R. B. Florística e Fitossociologia da Restinga Herbáceo-Arbustiva do Morro dos Conventos, Araranguá, SC. Dissertação de mestrado, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma (SC), 2006.

RODRIGUES, E. N. L.. Araneofauna de serapilheira de duas áreas de uma mata de restinga no município de Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Biotemas**, v. 18, n. 1, p. 73-92, 2005.

RODRIGUES, M. I. e IEMMA, A. F. **Planejamento Experimental e Otimização de Processos**. Campinas, SP: Cárita, 2 Ed., p.95-219, 2009.

RODRIGUEZ, J.; FERRAZ, A.; NOGUEIRA, R. P.; FREER, J.; ESPOSITO, E. e DURAN, N. Lignin biodegradation by the ascomycete *Chrysonilia sitophila*. **Applied Biochemical Biotechnology**, p. 233-242, 1997. In: ESPOSITO, E. e AZEVEDO, J. L. **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias: EDUCS, 2 ed., p.48-85, 2010.

ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R. e AZEVEDO, J. L. **Tratado de Microbiologia**. São Paulo: Manole, 1991.

ROSA, C. A.; MORAIS, P. B.; SANTOS, S. R.; PERES-NETO, P. R.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. e HAGLER, A. N. Yeast communities associated with diferente plant resources in sandy coastal plains of Southeastern Brazil. **Mycological Research**, v. 99, p. 1047-1054, 1995.

ROSSI, M. Fatores formadores da paisagem litorânea: A bacia do Guaratuba, São Paulo – Brasil. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), 1999. In: GOMES, F. H.; VIDAL-TORRADO, P.; MACÍAS, F.; GHERARDI, B. e PEREZ, L. O. Solos sob Vegetação de Restinga na Ilha do Cardoso (SP). I - Caracterização E Classificação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p.1563-1580, 2007.

ROSSMAN, A. Y. The need for identification services in agriculture. In: HAWKSWORTH, D. L. The identification and characterization of pest organisms. **CAB International**, Wallingford, p. 35-45, 1994.

RUEGGER, M. J. S. e TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Holos Environment**, v. 2, n. 2, p. 185-184, 2002.

SÁ, C. F. C. A vegetação da restinga de Ipitangas, Reserva Ecológica Estadual de Jacarepiá, Saquarema (RJ): Fisionomia e Listagem de Angiospermas. **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 31, p. 87-102, 1992.

- SACRAMENTO, A. C.; ZICKEL, C. S. e ALMEIDA JR., E. B. Aspectos Florísticos da Vegetação de Restinga no Litoral de Pernambuco. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 6, p. 1121-1130, 2007.
- SAHA, B. C. Production, purification and properties of endoglucanase from newly isolated strains of *Mucor circinelloides*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 1871-6, 2004.
- SALAMANCA, E. F.; RAUBUCH, M. e JOERGENSEN, R. G. Relationships between soil microbial indices in secondary tropical forest soils. **Applied soil Ecology**, v. 21, p. 211-219, 2002.
- SAMPAIO, D. Restinga. In: SAMPAIO, D.; SOUZA, V. C.; OLIVEIRA, A. A.; PAULA-SOUZA, J. E. e RODRIGUES, R. R. Árvores da restinga: Guia de identificação. **Neotrópica**, São Paulo, p. 25-30, 2005. In: ASSIS, A. M.; PEREIRA, O. J. e THOMAZ, L. D. Fitossociologia de uma floresta de restinga no Parque Estadual Paulo César Vinha, Setiba, município de Guarapari (ES). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 349-361, 2004.
- SANTOS, O. M.; OLIVEIRA, N. C. e NOVAES, R. F. Observações preliminares sobre fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em plantas crescendo em dunas na Bahia. **Revista CERES**, v. 42, n. 240, p. 191-202, 1995.
- SANTOS, L. C. **Laboratório Ambiental**, EDUNIOESTE, Cascavel, PR, 1999, p. 218-226, 1999.
- SANTOS, V. L. e LINARDI, V. R. **Process Biochemistry**, 2004. In: PASSOS, C. T.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J. e BURKERT, C. A. V. Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. isolada de um solo contaminado do sul do Brasil. **Química Nova**, v. 32, p. 950-954, 2009.
- SAUTTER, K. D. Meso (Acari e Collembola) e macrofauna (Oligochaeta) na recuperação de solos degradados. In: Recuperação de áreas degradadas. Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa – UFV, p.197 – 202, 1998.
- SCARANO, F. R. Structure, function and floristic relationships of plants communities in stressful habitats marginal to Brazilian Atlantic Rainforest. **Annals of Botany**, v. 90, p. 517-524, 2002.
- SCHLITTLER, L. A. F. S. Engenharia de um bioprocesso para a produção de etanol de cana-de-açúcar. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ), 2006.
- SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H. e MILANEZ, A. I. Fungos microscópicos da Mata Atlântica de Paranapiacaba, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 21, p.73-79,1998.
- SENA, A. R.; KOBLITZ, M. G. B.; NETO, A. G. e UETANABARO, A. P. T. Seleção de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. **Sitientibus**, Feira de Santana, n.35, p.91-98. 2006.
- SHALLOM, D. e SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 219-228, 2003.



SHULER, M. L. e KARGI, F. *Bioprocess Engineering – Basic Concepts – Prentice Hall Int. Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences*, New Jersey, 1992.

SIDRIM, J. J. C. e ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 388, 2004.

SILVA, V. F. N. Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Lorena (SP), 2009.

SILVA, S. S. L.; ZICKEL, C. S. e CESTARO, L. A. Flora vascular e perfil fisionômico de uma restinga no litoral sul de Pernambuco. **Acta Botânica Brasileira**, v. 22, p. 1123-1135, 2008. In: ALMEIDA JR, E. B.; OLIVO, M. A.; ARAÚJO, E. L. e ZICKEL, C. S. Caracterização da vegetação de restinga da RPPN de Maracaípe, PE, Brasil, com base na fisionomia, flora, nutrientes do solo e lençol freático. **Acta Botânica Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 36-48, 2009.

SILVA, S. M. e BRITTEZ, R. M. A Vegetação da Planície Costeira. In: MONTEZUMA, R. C. M. e ARAÚJO, D. S. D. Estrutura da Vegetação de uma Restinga Arbustiva Inundável no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio De Janeiro. **Pesquisas, Botânica**: Instituto Anchietano de Pesquisas, São Leopoldo, n. 58, p. 157-176, 2007.

SILVA, S. M. As formações vegetais da planície litorânea da Ilha do Mel, Paraná, Brasil: Composição florística e principais características estruturais. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), 1998. In: ASSIS, A. M.; PEREIRA, O. J. e THOMAZ, L. D. Fitossociologia de uma floresta de restinga no Parque Estadual Paulo César Vinha, Setiba, município de Guarapari (ES). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 349-361, 2004.

SILVA, S. M., BRITTEZ, R. M., SOUZA, W. S. e JOLY, C. A. Fitossociologia do componente arbóreo da floresta de restinga da Ilha do Mel, Paranaguá, PR. 1994. In: III SIMPÓSIO DE ECOSSISTEMAS DA COSTA SUL E SUDESTE BRASILEIRA, 1994, São Paulo. **Anais...**, São Paulo, p.33-48, 1994. In: ASSIS, A. M.; PEREIRA, O. J. e THOMAZ, L. D. Fitossociologia de uma floresta de restinga no Parque Estadual Paulo César Vinha, Setiba, município de Guarapari (ES). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 349-361, 2004.

SILVEIRA, M. H. Diversidade de besouros (Insecta, Coleoptera) de solo da restinga da Praia do Pântano do Sul, Florianópolis, SC, Brasil. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (SC), 2009.

SILVEIRA, F. Q. P.; SOUSA, M. V.; RICART, C. A. O.; MILAGRES, A. M. F.; MEDEIROS, C. L. e FILHO, E. X. F. A new xylanase from a *Trichoderma harzianum* strain. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 682-685, 1999.

SILVESTRIN, C. R. Bioeletricidade: reduzindo emissões e agregando valor ao sistema elétrico nacional. **Ethanol Summit**, São Paulo, 2009.

SOARES, E. F.; SILVA, A. C. J.; FRANCO, L. O.; GALDINO, R. M. N. e SANTOS, L. A. Identificação de fungos filamentosos em Colheres de pau. In: X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX 2010 – UFRPE, 2010, Recife (PE).

SOUZA, M. T. R. O Litoral Brasileiro. **Cultura R. IMAE**. São Paulo: v.5, n.11, p.63-67, 2004. In: DANIEL, R. B. Florística e Fitossociologia da Restinga Herbáceo-Arbustiva do Morro dos Conventos, Araranguá, SC. Dissertação de mestrado, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma (SC), 2006.

SOUZA, E. C. Restinga. **Revista brasileira de Geografia**, v.7, n. 4, p. 662-665, 1945. In: FREIRE, E. M. X. Estudo Ecológico e Zoogeográfico Sobre a Fauna de Lagartos (Sauria) das Dunas de Natal, Rio Grande do Norte e da Restinga de Ponta de Campina, Cabedelo, Paraíba, Brasil. **Revista brasileira de Zoologia**, v.13, n. 4, p. 903 – 921, 1996.

SUGYIAMA, M. e MANTOVANI, W. Fitossociologia de um trecho de mata de restinga na Ilha do Cardoso, SP. In: III SIMPÓSIO DE ECOSISTEMAS DA COSTA SUL E SUDESTE BRASILEIRA, 1994, São Paulo. **Anais...**, São Paulo, p.49-57, 1994. In: ASSIS, A. M.; PEREIRA, O. J. e THOMAZ, L. D. Fitossociologia de uma floresta de restinga no Parque Estadual Paulo César Vinha, Setiba, município de Guarapari (ES). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 349-361, 2004.

SUGIYAMA, M. Estudo de florestas da restinga da Ilha do Cardoso, Cananéia, São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Botânica**, v. 11, p. 119-159, 1998.

SUGUIO, K. **Dicionário da Geologia marinha**. São Paulo: Quieiroz, 1992. In: DANIEL, R. B. Florística e Fitossociologia da Restinga Herbáceo-Arbustiva do Morro dos Conventos, Araranguá, SC. Dissertação de mestrado, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma (SC), 2006.

SUGUIO, K. e TESSLER, M. G. 1984. Planícies de cordões litorâneos quaternários do Brasil: origem e nomenclatura. 1984. In: ASSIS, A. M.; PEREIRA, O. J. e THOMAZ, L. D. Fitossociologia de uma floresta de restinga no Parque Estadual Paulo César Vinha, Setiba, município de Guarapari (ES). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 349-361, 2004.

SUKUMARAN, R. K., SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Microbial cellulases: production, application and challenges. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 64, p. 832-844, 2005.

SUL, O. J.; KIM, J. H.; PARK, S. J.; SON, Y. J.; PARK, B. R.; CHUNG, D. K.; JEONG, C. S. e HAN, I.S. Characterization and molecular cloning of a novel endoglucanase from *Trichoderma* sp. C-4. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.66, p. 63-70, 2004.

SUNNA, A. e ANTRANKIAN, G. Xylanolytic enzymes for fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, p. 39-67, 1997.

STÜMER, S. L. e BELLI, M. M. Composition and seasonal variation of spore populations of arbuscular mycorrhizal fungi in dune soils on the island of Santa Catarina, Brazil. **Canadian Journal of Botany**, v. 72, p. 359-363, 1994.

SZENGYEL, Z. Cellulase production of *Trichoderma reesei* Rut C 30 using steam-pretreated spruce. Hydrolytic potential of cellulases on different substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84, p. 679-91, 2000.

TAVARES, S. R. L. Uso de leguminosas Arbóreas submetidas a inoculações com rizóbios e micorrizas arbusculares para revegetação do solo de restinga degradado. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica (RJ), 1998.

TAUK-TORNISIELO, S. M.; GARLIPP, A.; RUEGGER, M. J. S.; ATTILI, D. S. e MALAGUTTI, E. N. Soilborne filamentous fungi in Brazil. **Journal of Basic Microbiology**, v.45, p.72-82, 2005.

TISDALL, J. M. e OADES, J. M. Organic matter and water-stable aggregates in soils. **Journal Soil Science**, v. 33, p. 141-163,1982.

TORZILLI, A. P., e ISBISTER, J. D. Comparison of coal solubilization by bacteria and fungi. **Biodegradation**, p. 55–62, 1994.

TRINDADE, A. Estudo florístico e fitossociológico do estrato arbustivo-arbóreo de um trecho de floresta arenícola costeira do Parque Estadual das Dunas – Natal (RN). Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife (PE), 1991. In: ASSIS, A. M.; PEREIRA, O. J. e THOMAZ, L. D. Fitossociologia de uma floresta de restinga no Parque Estadual Paulo César Vinha, Setiba, município de Guarapari (ES). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 349-361, 2004.

TRÜPER, H. G. Prokaryotes: an overview with respect to biodiversity and environmental importance. **Biodiversity and Conservation**, v.1, p. 227-236, 1992.

TSAO, G. T.; XIA, L.; CAO, N. e GONG, C. S. Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* for cellobiose production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 743-749, 2000.

TOLAN, J. S. e FODDY, B. Cellulase from submerged fermentation. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, v. 65, p. 41-67, 1999.

TÓTOLA, M. R. Bioindicadores de qualidade de solo. In: 4º ENCONTRO NACIONAL DE BIÓLOGOS, 2002, Ouro Preto, MG. **Anais...** Ouro preto, p.28, 2002.

U.S. DOE. Genomics GTL Roadmap, DOESC-0090, Department of Energy Office of Science, p. 204, 2005. Disponível em: <https://public.ornl.gov/site/gallery/detail.cfm?id=181&topic=&citation=&general=cellulose%20molecule&restsection=all>. Acesso em outubro de 2011.

VÁSQUEZ, M. P.; DA SILVA, J. N. C.; DE SOUZA JR., M. B. e PEREIRA JR., N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 137-140, 2007.

VELAZQUEZ-CEDENO, M. A.; MATA, G. e SAVOIE, J. M. Waste reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulpe changes in the production of

some lignocellulolytic enzymes. **Word Journal Microbiol and Biotechnology**, v. 3, p. 201-207, 2002.

VELOSO, H. P. Manual técnico da vegetação brasileira. **Manual técnico em geociências**, Rio de Janeiro, n. 1, 1992. In: ALMEIDA JR, E. B.; OLIVO, M. A.; ARAÚJO, E. L. e ZICKEL, C. S. Caracterização da vegetação de restinga da RPPN de Maracaípe, PE, Brasil, com base na fisionomia, flora, nutrientes do solo e lençol freático. **Acta Botânica Brasílica**, v. 23, n. 1, p. 36-48, 2009.

VIANA, B. F.; SILVA, F. O. e KLEINERT, A. M. P. A flora apícola de uma área restrita de dunas litorâneas, Abaeté, Salvador, Bahia. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n.1, p.13-25, 2006.

WAECHTER, J. L. Aspectos ecológicos da vegetação da restinga no Rio Grande do Sul, Brasil. **Comunicação Científica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - Série Botânica**, n.33, p. 49-68, 1985. In: DANIEL, R. B. Florística e Fitossociologia da Restinga Herbáceo-Arbustiva do Morro dos Conventos, Araranguá, SC. Dissertação de mestrado, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma (SC), 2006.

XIMENES, E. A. e FELIX, C. R. O sistema celulolítico de microrganismos anaeróbios: uma mini-revisão sobre o celossoma. **Universitas Ciências da Saúde**, v.1, p. 335-341, 2002.

ZEILINGER, S.; HALLER, M.; MACH, R. e KUBICEK, C. P. Molecular characterization of a cellulase-negative mutant of *Hypocrea jeconina*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 277, p. 581-588, 2000.

ZHANG, J. e SMITH, K. R. Household air pollution from coal and biomass fuels in China: Measurements, health impacts, and interventions. **Environ Health Perspective**, v. 115, n. 6, p. 848-855, 2007.

ZHANG, Y. H. P e LYND, L. R.; **Biotechnology and Bioengineering**, v.88, p.797, 2004. In: CASTRO, A. M. e PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2009.

ZICKEL, C. S.; VICENTE, A.; ALMEIDA JR., E. B.; CANTARELLI, J. R. R. e SACRAMENTO, A. C. Flora e vegetação das restingas no Nordeste Brasileiro. p. 689-701, 2004. In: ALMEIDA JR, E. B.; OLIVO, M. A.; ARAÚJO, E. L. e ZICKEL, C. S. Caracterização da vegetação de restinga da RPPN de Maracaípe, PE, Brasil, com base na fisionomia, flora, nutrientes do solo e lençol freático. **Acta Botânica Brasílica**, v. 23, n. 1, p. 36-48, 2009.