

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA CELULOLÍTICA DO FUNGO
TRICHODERMA SP UTILIZANDO A CASCA DE CAFÉ COMO SUBSTRATO**

**EVALUATION OF THE CELLULOLYTIC ENZYMATIC ACTIVITY OF THE FUNGUS
TRICHODERMA SP. USING COFFEE HUSK AS A SUBSTRATE**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CELULOLÍTICA DEL HONGO
TRICHODERMA SP. UTILIZANDO CÁSCARA DE CAFÉ COMO SUSTRATO**

 <https://doi.org/10.56238/arev7n11-162>

Data de submissão: 14/10/2025

Data de publicação: 14/11/2025

Maria Júlia Flores Fernandes Dias Leandro

Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos

Instituição: Universidade Federal de São João del-Rei

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3723301392958548>

Roberto Guimarães da Cunha Filho

Mestre em Engenharia Química

Instituição: Universidade Federal de São João del-Rei

E-mail: betolga.cunha@hotmail.com

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6540618079264893>

Renata Carolina Zanetti Lofrano

Doutorado em Ciências

Instituição: Universidade Federal de São João del-Rei

E-mail: renataczlofrano@gmail.com

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5561482457720983>

Boutros Sarrouh

Doutorado em Biotecnologia Industrial

Instituição: Universidade Federal de São João del-Rei

E-mail: bsarrouh@ufs.edu.br

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7204534064025448>

RESUMO

O fungo *Trichoderma sp* foi inoculado em meio mineral usando casca de café 2% (p/v) como fonte de carbono para a fermentação submersa. Segundo os resultados obtidos, observou-se uma máxima atividade da enzima Endoglucanase de $0,241 \pm 0,00$ UI/mL após 8 dias de cultivo, já a enzima β -glicosidase apresentou atividade máxima de $26,90 \pm 0,03$ UI/mL após o mesmo período de tempo. Na etapa de aplicação do extrato enzimático bruto para a hidrólise da casca obteve-se 2,5 g/L de glicose liberada em 24 horas.

Palavras-chave: Atividade Enzimática. Casca de Café. *Trichoderma sp*. Celulase.

ABSTRACT

The fungus *Trichoderma sp.* was inoculated in a mineral medium using 2% (w/v) coffee husk as a carbon source for submerged fermentation. According to the results obtained, a maximum

endoglucanase enzyme activity of 0.241 ± 0.00 IU/mL was observed after 8 days of cultivation, while the β -glucosidase enzyme showed a maximum activity of 26.90 ± 0.03 IU/mL after the same period. In the step of applying the crude enzymatic extract for husk hydrolysis, 2.5 g/L of glucose was released in 24 hours.

Keywords: Enzymatic Activity. Coffee Husk. *Trichoderma sp.* Cellulase.

RESUMEN

El hongo *Trichoderma sp.* se inoculó en un medio mineral utilizando cáscara de café al 2 % (p/v) como fuente de carbono para fermentación sumergida. Según los resultados obtenidos, se observó una actividad máxima de la enzima endoglucanasa de $0,241 \pm 0,00$ UI/mL tras 8 días de cultivo, mientras que la enzima β -glucosidasa mostró una actividad máxima de $26,90 \pm 0,03$ UI/mL tras el mismo periodo. Al aplicar el extracto enzimático crudo para la hidrólisis de la cáscara, se liberaron 2,5 g/L de glucosa en 24 horas.

Palabras clave: Actividad Enzimática. Cáscara de Café. *Trichoderma sp.* Celulasa.

1 INTRODUÇÃO

A Biomassa lignocelulósica é o mais abundante recurso biológico renovável da terra, devido a isso e a sua composição (lignina, hemicelulose e celulose) existe uma tendência mundial para a hidrólise de materiais lignocelulósicos, buscando açúcares fermentescíveis para a produção de bioetanol em larga escala. Porém, o uso de celulases na hidrólise de materiais lignocelulósicos tem como entraves o custo de produção, que pode ser superado utilizando microrganismos para a produção dessas enzimas. A expectativa é de que o mercado de celulases pode ser superior a 400 milhões de dólares por ano com a possível utilização das enzimas na hidrólise de palha de milho nos Estados Unidos da América para a produção de etanol de biomassa (Zhang et al., 2006).

A estimativa é que um bilhão de toneladas de biomassa seca produz entre 80-130 bilhões de galões de etanol celulósico. No Brasil a grande disponibilidade de biomassa lignocelulósica de baixo custo estimula a busca por microrganismos mais eficientes no uso desse resíduo (Zhang, 2008). Para a produção de etanol, a hidrólise química apresenta baixo rendimento, pois não degrada totalmente a biomassa pelo uso de ácido e ainda há a formação de compostos que, além de não serem fermentescíveis, podem inibir a atividade da levedura. Além do que, o uso frequente de ácido causa corrosões nos equipamentos e aumenta os riscos de acidentes pelo seu manuseio. Dessa forma, a hidrólise enzimática tem sido a mais utilizada (Menezes, 1980).

Um processo biotecnológico capaz de produzir açúcares viáveis a partir de biomassa lignocelulósica irá gerar um fim comercial para esse resíduo, contribuindo dessa forma para agregar valor ao processo produtivo e ao mesmo tempo encontrar uma solução sustentável em termos ambientais.

Uma das aplicações mais importantes das enzimas do complexo celulolítico atualmente é a hidrólise de biomassas vegetais. A reutilização da biomassa lignocelulósica significa agregar valor à cadeia produtiva, reduzindo seu acúmulo no meio ambiente. Nesse sentido surge o uso de enzimas celulolíticas visando à hidrólise dessa biomassa vegetal e consequentemente a liberação de açúcares redutores que poderão ser utilizados, em processos biotecnológicos como blocos de construção para a obtenção de gama diversificada de produtos, que abrange desde biocombustíveis até ácidos orgânicos e biopolímeros.

Este trabalho utilizou a casca de café, uma biomassa lignocelulósica, como substrato. Essa utilização requer pré-tratamento, iniciado com a moagem da casca de café, seguida da hidrólise ácida para liberar os açúcares contidos na fração hemicelulósica, e também a hidrolise alcalina para a remoção da lignina, tornando-se o substrato celulósico da casca de café mais susceptível a ação das enzimas celulolíticas. Por fim a hidrólise enzimática, sendo que o fungo isolado em estudo, utilizando

a biomassa lignocelulósica como fonte de carbono, irá produzir de forma extracelular as enzimas responsáveis por degradar a celulose e a consequente produção de açúcares redutores.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PRODUÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

O fungo *Trichoderma sp.*, popularmente conhecido como fungo da podridão branca utilizado neste trabalho (Figura 1), foi previamente isolado e cultivado pelo Grupo de Pesquisa do Professor Boutros Sarrouh, do Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos. Universidade Federal de São João Del Rei. Campus Alto Paraopeba Ouro Branco/MG.

Figura 1. Fungo isolado da madeira que será utilizado neste estudo.



Fonte: Autores.

Para a inoculação do fungo isolado em meio líquido, contendo a casca de café como única fonte de carbono, três fragmentos de ágar contendo hifas do fungo em estudo foram retirados de uma placa de petri com auxílio de uma espátula e inoculadas em Erlenmeyers de 125mL contendo 50mL de meio líquido mineral e casca de café 2% (p/v). O meio mineral composto de (p/v): KH₂PO₄ 0,7%, NaH₂PO₄ 0,4%, MgSO₄ 0,02%, (NH₄)₂SO₄ 0,1% além de extrato de levedura 0,06% será previamente autoclavado a 120 °C durante 15min.

Os frascos foram submetidos a uma incubador orbital com agitação de 180 rpm e temperatura de 28°C durante 11 dias. A cada 24 horas foram coletadas amostras do fermentado com o auxílio de uma micropipeta e transferidas para um microtubo tipo eppendorf e centrifugadas durante 20 minutos e rotação de 10000 xg. É importante ressaltar que toda a casca de café utilizada nesse trabalho passou por pré-tratamentos de lavagem, Trituração e hidrólise ácida e alcalina.

2.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENDOGLUCANASE

A atividade de Endoglucanase foi determinada em função da sua capacidade de degradação da casca de café, sendo os açúcares redutores liberados foram quantificados pelo método do ácido

dinitrosalicílico (DNS). Dessa forma, foram retirados 0,250mL do extrato enzimático bruto do fungo e colocados em tubos de ensaio contendo 0,250mL de carboximetilcelulose. Para o controle, adicionou-se 0,250mL de tampão acetato 0,1M pH 4,8, em substituição do extrato enzimático. Os tubos foram colocados em banho-maria a 50°C por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se nos tubos de ensaio 0,75 mL da solução de (DNS) que posteriormente foram submetidos a banho fervente de 100°C por 5 minutos, seguidos de mais 5 minutos em banho de gelo para encerrar a atividade enzimática. Finalmente os tubos foram completados com 3,75mL de água destilada. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm e os valores de absorbância foram convertidos em quantidades equivalentes de glicose a partir de curva padrão previamente construída; considerando que 1 Unidade Internacional (IU) equivale a 1 μ mol de glicose liberada por minuto.

Para a construção da curva padrão, utilizou-se uma solução de glicose, com concentrações entre 0,1 a 1,0 g/L. Em um tubo de ensaio adicionou-se 1,5mL do reagente de DNS a 1 mL dessa solução, em seguida esse tubo foi levado a fervura por 5 minutos e completado com água destilada a um volume de 10 mL A leitura foi realizada a 540 nm.

2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA B-GLICOSIDASE

A avaliação da atividade β -glicolítica foi realizada utilizando o substrato p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNP β G). Primeiramente, foram adicionados 1,2 mL de p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo nos tubos e aquecidos em banho-maria a 30°C por 10 minutos. Em seguida, foi acrescentado 0,3mL dos extratos enzimáticos e para o controle 0,5mL de tampão fosfato-citrato 0,1M pH 5,0. Todos os tubos foram colocados novamente em banho-maria a 30°C por 30 minutos. A reação foi interrompida acrescentando 1,5 mL da solução de bicarbonato de sódio 0,5M. A leitura foi realizada a 420 nm.

Uma unidade Internacional (IU) de atividade β -glicosidase é definida como quantidade de enzima requerida para liberar 1 μ mol de p-nitrofenol do substrato por minutos. Assim, para a quantificação, construiu-se a curva padrão utilizando água, bicarbonato de sódio e p-nitrofenol (20-160 μ mol.mL⁻¹). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

2.4 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A atividade da enzima Endoglucanase foi caracterizada submetendo o extrato enzimático bruto obtido no dia de cultivo que apresentou a melhor atividade enzimática. As condições utilizadas para os ensaios de caracterização foram realizados em um intervalo de temperatura de 40 a 70°C e pH de

3,0 a 6,0. Em relação à avaliação do efeito do pH, foram realizados ensaios utilizando tampões de fosfato-citrato nos valores de 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

2.5 APLICAÇÃO ENZIMÁTICA NA CACA DO CAFÉ

A aplicação foi realizada após cultivar o fungo em meio contendo carboximetilcelulose como substrato durante 6 dias de cultivo. Em seguida o meio foi filtrado utilizando gaze previamente esterilizada e centrifugado para retirar o restante de micélio contido no meio, obtendo apenas o extrato enzimático bruto. O extrato enzimático bruto obtido foi aplicado na casca de café, sendo 60 mL de extrato para 5 g de casca de café. Foram feitas quatro soluções em erlemeyers de 125 mL cada, duas com casca de café pré-tratadas químicamente, e duas com casca de café sem pré-tratamento químico a fim de obter os resultados em duplicata e dados para comparações.

Ambas as cascas foram lavadas e trituradas, porém a que passou por tratamento químico também foi submetida a hidrólise ácida, seguida da hidrólise alcalina. As condições de hidrólise ácida foram 10% (p/v) de ácido sulfúrico por 10 min a 121 °C e de hidrólise alcalina para 12% (p/v) de casca para 3,5% (p/v) de hidróxido de sódio a 121 °C por 30 min.

Os frascos foram submetidos a um agitador orbital (shaker) a temperatura de 50°C e agitação de 180 rpm durante cinco dias. Sendo que, a cada 24 horas foram coletadas amostras com o auxílio de uma micropipeta e transferidas para um microtubo tipo eppendorf e centrifugadas durante 20 minutos e rotação de 10000 xg. Os açúcares redutores liberados foram quantificados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS).

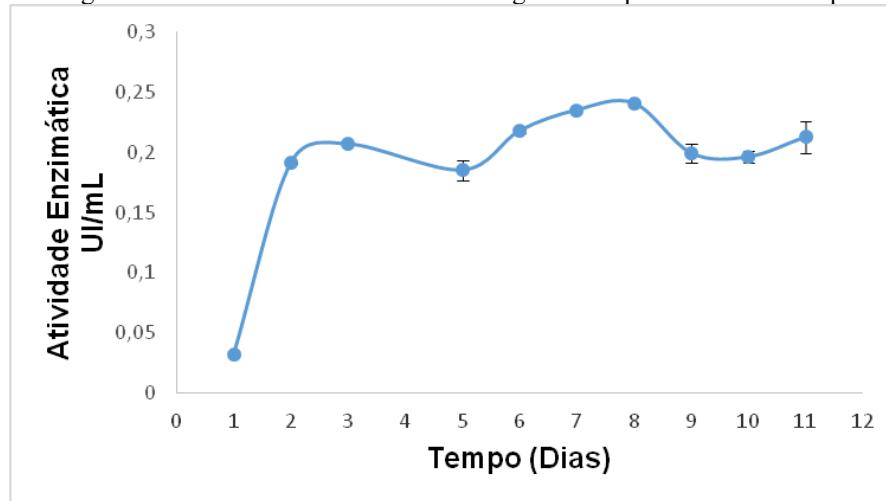
Em seguida, foram retirados 0,2mL da amostra e transferiu-se para um tubo de ensaio. Para o controle, adicionou-se 0,2 mL de água destilada em um tubo de ensaio, em substituição do extrato enzimático. Em seguida, adicionou-se nos tubos de ensaio 0,3 mL da solução de DNS que posteriormente foram submetidos a banho fervente de 100°C por 5 minutos, seguidos de mais 5 minutos em banho de gelo para encerrar a atividade enzimática. Finalmente os tubos foram completados com 1,5 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm e os valores de absorbância foram convertidos em quantidades equivalentes de glicose a partir de curva padrão previamente construída. Considerando que 1 Unidade Internacional (IU) equivale a 1 µmol de glicose liberada por minuto.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENDOGLUCANASE

Esse estudo teve como objetivo avaliar o crescimento celular e a produção da enzima celulase produzida pelo fungo isolado. A Figura 2 mostra a curva de cinética enzimática do fungo isolado, representada pela atividade da enzima Endoglucanase em função do tempo de cultivo.

Figura 2. Cinética de crescimento da Endoglucanase pelo *Trichoderma* sp.



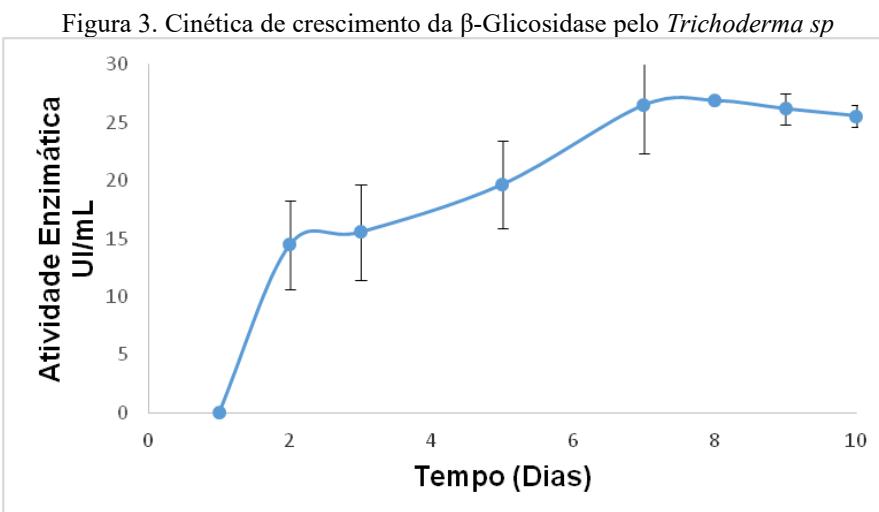
Fonte: Autores.

Conforme mostrado na Figura 2, observou-se uma rápida adaptação do fungo isolado no meio de cultivo utilizando a casca de café como única fonte de carbono. O mesmo apresentou uma atividade celulolítica máxima de $0,24 \pm 0,00$ UI/mL, após oito dias de fermentação.

Aguiar & Menezes (2000), ao utilizar *Aspergillus niger* IZ-9 após sete dias de incubação, utilizando bagaço de cana de açúcar como único substrato, obtiveram valores de atividade de Endoglucanase de 0,2 UI/ml, valores próximos ao observado com o fungo estudado neste trabalho. Já conforme o trabalho de Saha (2004), utilizando o fungo *Mucor cincinnelloides* e carboximetilcelulose (CMC) como substrato encontrou uma atividade máxima de 0,35U/ml, possivelmente um valor maior do que o encontrado neste trabalho devido ao substrato utilizado, o CMC é mais vulnerável ao ataque enzimático do que uma biomassa lignocelulósica, em decorrência de sua estrutura.

3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA B-D-GLICOSIDASE

Essa etapa do trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento celular e a produção da enzima β -Glicosidase pelo fungo isolado da madeira. A Figura 3 mostra a curva de crescimento do fungo isolado, representada pela atividade da enzima β -Glicosidase em função do tempo de cultivo.



Fonte: Autores.

Conforme mostrado na Figura 3, observou-se uma rápida adaptação do fungo isolado no meio de cultivo utilizando a casca de café como única fonte de carbono. O mesmo apresentou uma atividade celulolítica máxima de $26,89 \pm 0,0296$ UI/mL após oito dias de fermentação, exibindo logo em seguida uma pequena queda deste índice de atividade, evidenciando o oitavo dia como o pico máximo de atividade enzimática produzida pela β -glicosidase.

Se comparado com o trabalho de Aguiar & Menezes (2000), este valor é considerado promissor. O valor encontrado de atividade β -D-Glicolítica por esses autores utilizando o fungo *Aspergillus niger* IZ-9 em fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar tratado foi de apenas 1,4 UI/mL após sete dias de cultivo.

Conforme os resultados obtidos na Figura 2 e 3 observou-se que o fungo em estudo apresentou uma maior capacidade enzimática voltada para a produção de β -glicosidase, atingindo valores de atividade enzimática até 100 vezes maiores em comparação com a atividade da enzima Endoglucanase.

3.3 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A caracterização da atividade enzimática celulolítica em relação às condições ótimas de pH e temperatura, foi realizada utilizando os extratos enzimáticos brutos obtidos após o oitavo dia de cultivo por ter apresentado a maior atividade enzimática alcançada, conforme mostrado na Figura 4.

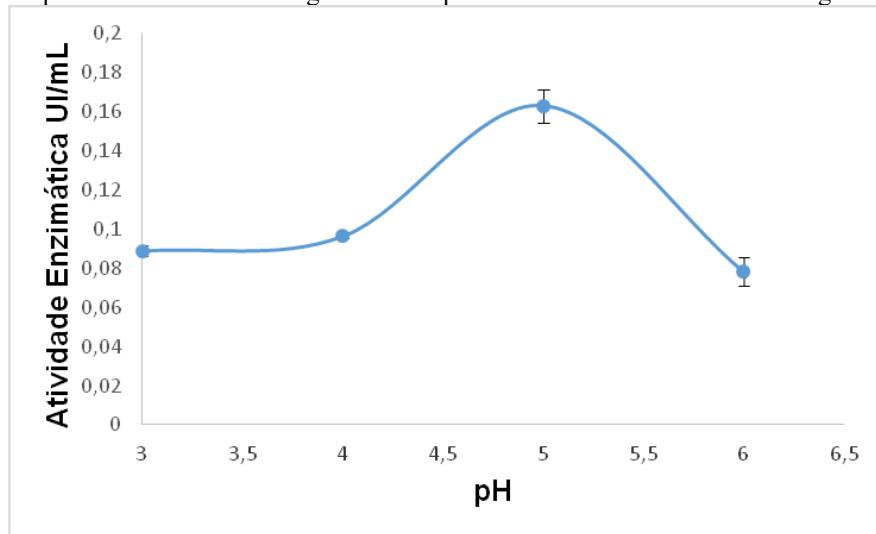
3.4 EFEITO DO PH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENDOGLUCANASE

O pH apresenta papel importante nas reações de hidrólise catalisadas por enzimas. Sua variação pode ser relacionada a possíveis mudanças conformacionais, alterações do estado de ionização e

dissociação da enzima no meio reacional (macroambiente) levando à perda na função da enzima até se tornar inativa (Simões et al., 2011).

De forma geral, as celulases produzidas por fungos filamentosos apresentam valores ótimos de pH na faixa ácida (3,6 a 5,0), enquanto que bactérias chegam a produzir celulases altamente ativas em valores de pH alcalinos (Castro et al. 2009). Os dados obtidos neste estudo na caracterização da Endoglucanase em relação à variação de pH estão apresentados na Figura 4.

Figura 4. Efeito do pH na atividade de Endoglucanase expressada nos extratos brutos do fungo isolado da madeira.



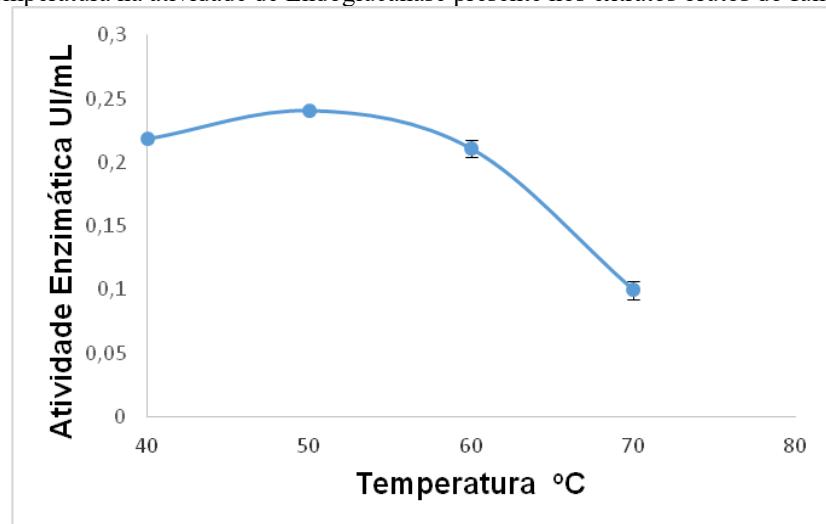
Fonte: Autores.

Conforme os resultados apresentados na Figura 4, observou-se que em pH 3 e 4 não houve aumento significativo na atividade enzimática da Endoglucanase do fungo de podridão branca, por outro lado em pH 5 a mesma alcançou uma atividade máxima de $0,16 \pm 0,0085$ UI/mL, utilizando tampão fosfato-citrato. Saha (2004) utilizou o fungo *Mucor ciccinelloides* para produzir, purificar e caracterizar a endoglucanase produzida por ele. Na caracterização do pH utilizando o tampão fosfato-citrato foi observado uma ótima atividade enzimática em pH 5, como encontrado neste trabalho, levando a considerar o pH 5 como ótimo de trabalho da endoglucanase.

3.5 EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENDOGLUCANASE

A influência da temperatura na cinética da reação enzimática se deve aos aumentos de velocidade de reação. A velocidade aumenta porque mais moléculas adquirem energia suficiente para atingir o estado de transição. Esse efeito é observado em um intervalo de temperatura compatível com a manutenção da estrutura espacial da enzima (Feitosa, 2009). Os resultados obtidos na caracterização da Endoglucanase em relação à temperatura estão apresentados na Figura 5.

Figura 5. Efeito da temperatura na atividade de Endoglucanase presente nos extratos brutos do fungo isolado da madeira.



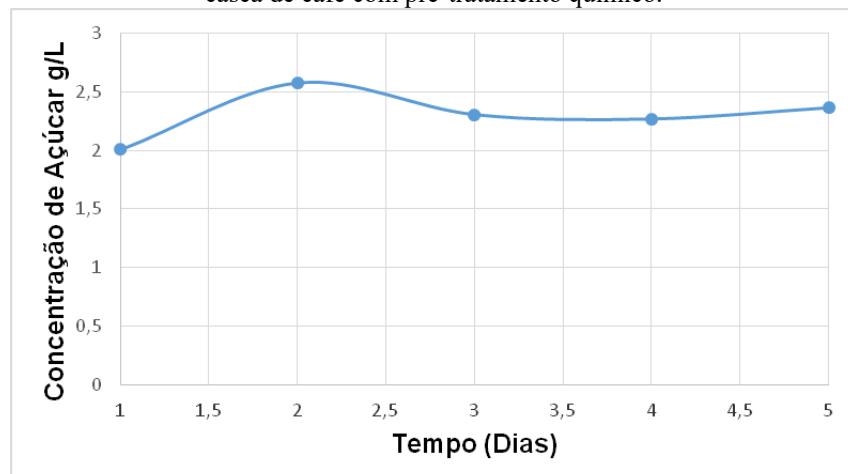
Fonte: Autores.

Segundo mostrado na Figura 5 observa-se que, a temperatura da reação teve uma influência direta na atividade enzimática da Endoglucanase do fungo isolado. Dessa forma constatou-se uma atividade enzimática máxima de $0,24 \text{ UI/mL} \pm 0,00$ a uma temperatura ótima de 50°C . Por outro lado, observou um decréscimo da mesma a uma temperatura de 60°C alcançando um valor mínimo de $0,099 \pm 0,007 \text{ UI/mL}$ a 70°C . Saha (2004) encontrou atividade máxima da endoglucanase do fungo *Mucor ciccinelloides* sob temperatura de 55°C ao incubar por 30 minutos, temperatura ideal média da endoglucanase da maioria dos fungos, como pode ser observado na Figura 5. Em temperatura de 60°C a atividade enzimática alcançou 84% da atividade enzimática total calculada, e a temperatura de 70°C a atividade enzimática foi de 29% do total. Valores muito próximos dos encontrados neste trabalho, em que a 60°C a atividade foi 87,5% do total. A temperatura de 70°C a atividade enzimática exercida pelo fungo da podridão branca foi maior do que a apresentada pelo fungo *Mucor ciccinelloide*, sendo 41,3% da atividade enzimática total.

3.6 APLICAÇÃO ENZIMÁTICA NA CACA DO CAFÉ

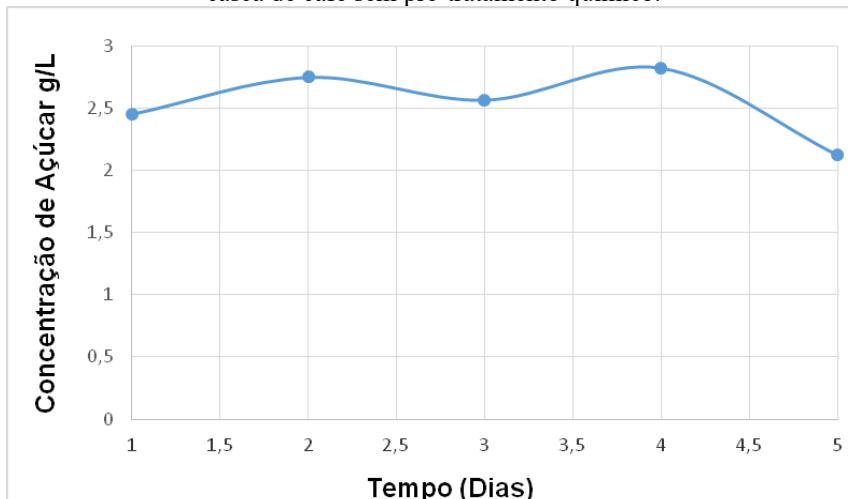
A etapa de aplicação visou-se avaliar a atividade enzimática do extrato bruto enzimático produzido pelo fungo *Trichoderma* sp. buscando uma ação específica. Neste caso o objetivo era produzir açúcares fermentescíveis, através de dois ensaios, um contendo casca de café lavada, triturada e tratada com hidrólise ácida, seguida da hidrólise alcalina e outro ensaio contendo casca de café apenas lavada e triturada, sem nenhum tratamento químico. Ambos foram realizados em duplicata. Os resultados são demonstrados nas Figuras 6 e 7.

Figura 6. Concentrações de açúcar obtidas após aplicar o extrato enzimático bruto produzido pelo *Trichoderma sp.* em casca de café com pré-tratamento químico.



Fonte: Autores.

Figura 7. Concentrações de açúcar obtidas após aplicar o extrato enzimático bruto produzido pelo *Trichoderma sp.* em casca de café sem pré-tratamento químico.



Fonte: Autores.

Conforme os dados apresentados na Figura 6, observou-se que a concentração de açúcar obtida na casca sem pré-tratamento químico foi maior do que a obtida na casca com pré-tratamento químico (Figura 7), o que fugiu do esperado visto que o pré-tratamento visa deixar a porção de celulose mais susceptível a ação enzimática. Esse resultado pode ser justificado pela presença de enzimas xilanases no extrato enzimático bruto, pois este não foi purificado para conter apenas celulases, e como a casca sem pré-tratamento químico ainda continha a porção de hemicelulose da biomassa, porção que ao ser submetida à ação das xilanases pode ter sido hidrolisada em xilose, pentose predominante na hemicelulose. Esse açúcar pode ter influenciado no resultado, tornando a concentração mais alta do que o esperado.

4 CONCLUSÃO

A produção da enzima Endoglucanases pelo fungo *Trichoderma* sp. em fermentação submersa alcançou um valor máximo de $0,24 \pm 0,00$ UI/mL após oito dias de fermentação, já a enzima β -glicosidase apresentou atividade máxima de $26,89 \pm 0,0296$ UI/mL após o mesmo período de tempo, demonstrando dessa forma o seu potencial na produção da enzima β -glicosidase. Os extratos enzimáticos brutos de endoglucanase submetidos às diferentes condições de temperatura e pH, apresentaram uma atividade endoglicolítica máxima a uma temperatura de 50°C e pH 5. Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados na literatura para outros fungos que apresentam atividade celulolítica e demonstraram uma atividade celulolítica promissora visando uso futuro do *Trichoderma* sp. na produção de etanol de segunda geração.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPEMIG, CNPq e UFSJ pelo apoio financeiro na execução do projeto trabalho de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Aguiar, C.L.; Menezes, T. J. B. Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v.18, p.57-70, 2000.
- Castro, A. M.; Pereira, J R., N. Produção, Propriedades e Aplicação de Celulases na Hidrólise de Resíduos Agroindustriais. Quim. Nova, Rio de Janeiro V.33, No. 1, p. 181-188, 2010.
- Feitosa, I. C. Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa. Dissertação (Mestrado em Engenharias de Processos) – Universidade Tiradentes, 2009.
- Menezes, T. J. B. de. Etanol, o combustível do Brasil. São Paulo: Agronômica Ceres, 233p. 1980.
- Zhang, Y. H. P; Himmel, M. E.; Mielenz, J. R. Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies. Biotechnology Advances, New York, v. 24, p. 452-481, 2006.
- Saha, B. C. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. Process Biochemistry, v. 39, p.1871-1876, 2004.
- Simões, A. S.; Mori, R.Y.; Faria, R.; Castro, H. F.; Mendes, A. A. Desempenho da matriz híbrida SiO₂-quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa*. Quím Nova, v. 34, n. 1, p. 33-38, 2011.
- Zhang, Y. H. P.; J. Ind. Microbiol Biotechnol. V. 35, n.367, 2008.