

OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS DE MINHOCA COM O USO DA ENZIMA *FLAVOURZYME*

Mariano Rodrigues¹, Lucélia Hoehne², Eduardo Miranda Ethur³,
Claucia Fernanda Volken de Souza⁴, Wagner Manica Carlesso⁵

Resumo: Hidrolisados são proteínas que produzem peptídeos de vários tamanhos. Vários pesquisadores demonstraram a possibilidade de se obter hidrolisados proteicos de origem animal a partir de enzimas, utilizando como matéria-prima peixes e frango. Este trabalho teve como objetivo obter hidrolisados proteicos utilizando como matéria-prima a minhoca, pois até hoje tem sido pouco utilizada na obtenção desses produtos. Para isso, os hidrolisados foram obtidos após hidrólise enzimática, variando-se a concentração enzima/substrato, pH, temperatura, tempo de hidrólise e agitação do meio, utilizando a enzima *Flavourzyme* (Novozymes). Os resultados obtidos demonstraram que a enzima *Flavourzyme* apresentou baixo teor de proteína solúvel, sugerindo estudos com outras enzimas a partir dessa matéria-prima.

Palavras-chave: Hidrólise. Minhocas. Enzimas.

1 INTRODUÇÃO

Hidrolisados são produtos que podem ser utilizados em vários produtos alimentícios, devendo ser entendidos como proteínas que são separadas em peptídeos de vários tamanhos (MARTINS; COSTA E PRENTICE-HERNANDEZ, 2009). Relata-se que a hidrólise de proteínas tem como principais objetivos alterar as propriedades funcionais e produzir aminoácidos e pequenos peptídeos (ROMAN E SGARBIERI, 2005), visto que uma alimentação com hidrolisados proteicos pode proporcionar melhor utilização das proteínas, sendo a disponibilidade de aminoácidos variável (SGARBIERI, 1996).

Segundo Pigott (1982), métodos químicos e biológicos são utilizados para realizar a hidrólise, predominando o método químico na prática industrial. Porém, quando o intuito é obter produtos com alta funcionalidade e valor nutritivo o método biológico com a ação de enzimas deve ser usado. Segundo Fonkwe e Singh (1996), a hidrólise enzimática é mais simples, eficiente e rápida, permitindo o controle do processo, ocasionando a obtenção de produtos com melhores propriedades. Alguns fatores, como reagentes químicos, tipo da enzima e substrato, pH, temperatura, tempo de incubação e concentração da enzima, são fatores determinantes para a produção de hidrolisados por via enzimática (ADLER, 1986).

1 Químico. Mestre em Biotecnologia/Univates. Professor do Curso Técnico em Química da Univates.

2 Química. Doutora em Química/UFSM. Coordenadora do Curso de Química Industrial da Univates.

3 Químico. Doutor em Química/UFSM. Professor da Univates.

4 Química. Doutora em Biologia Celular e Molecular/UFRGS. Professor da Univates.

5 Graduando em Engenharia Ambiental/Univates.

Já existem na literatura estudos relacionados à hidrólise enzimática de pescados (BHASKAR et al., 2008; JUN et al., 2004; MARTINS; COSTA; PRENTICE, 2009) e frango (CENTENARO, 2009; KUROSAWA et al., 2009; ROSSI, 2007; SCHMIDT; SALLAS-MELLADO, 2009; OLIVEIRA; FRANZEN; TERRA, 2014). Há poucos relatos na literatura de hidrolisados de minhoca (LIU et al., 2003). Sendo assim, torna-se importante este estudo visto que elas contêm cerca de 70% de proteínas na sua composição (base seca) e todos os aminoácidos essenciais em sua constituição, sendo utilizadas na aeração de solos, na produção de húmus por vermicompostagem, na alimentação de pequenos animais (na forma de farinha) e na alimentação humana em países orientais (PEREIRA, 1997).

Diversos estudos relatam a obtenção de hidrolisados de proteína animal com a utilização da enzima *Flavourzyme* (SCHMIDT E SALLAS-MELLADO, 2009), (CENTENARO; PIOTROWICZ; PRENTICE-HERNANDEZ, 2008), (MARTINS; COSTA; PRENTICE-HERNANDEZ, 2009) (CAPOBIANGO et al., 2006). A *Flavourzyme* é uma enzima produzida pela fermentação de um tipo de *Aspergillus oryzae*, apresentando pH ótimo entre 5,0 e 7,0 e temperatura ótima em torno de 50 °C (ROSSI, 2007).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho é avaliar a obtenção de hidrolisados de minhocas com o uso da enzima *Flavourzyme*, variando-se fatores como pH, temperatura, tempo de incubação, relação enzima/substrato e agitação do meio reacional.

2 METODOLOGIA

2.1 Soluções tampões

As soluções tampões foram preparadas com fosfato de sódio monobásico e dibásico, utilizando-se pHmetro de bancada digital marca Digimed, modelo DM-20 (LUTZ, 2005).

2.2 Enzima utilizada

A enzima utilizada neste estudo foi a *Flavourzyme* 1000 L MG, fornecida pela Novozymes Latin America Ltda.

2.3 Hidrólise enzimática das minhocas

Para a realização deste trabalho foram utilizadas amostras de minhocas (25 g) da espécie Vermelha da Califórnia (*Eisenia andrei*), oriundas dos minhocários verticais instalados no laboratório de Experimentação I da Univates, provenientes do projeto de pesquisa intitulado "Bioprodução de hidrolisados proteicos e avaliação de metais pesados em farinha de minhoca e em biossólidos a partir de vermicompostagem vertical". As minhocas foram alimentadas exclusivamente com resíduos orgânicos, dando preferência a alimentos sem sal, sendo mantidas a uma temperatura média de 25 °C e com teor de umidade do húmus em 80%.

A Figura 1 exemplifica as minhocas utilizadas neste trabalho, oriundas de minhocários utilizados para vermicompostagem. E a Figura 2 representa um minhocário vertical.

Figura 1: Minhocas em processo de vermicompostagem



Fonte: redwormcomposting.com

Figura 2: Minhocário vertical



Fonte: minhocario.eco.br

Baseado em trabalhos de Chae et al. (1998); Hathwar et al. (2011); Schmidt (2008); Schmidt; Sallas-Mellado (2009) e Rossi (2007) sobre hidrólise enzimática, optou-se em realizar um planejamento experimental para o processo de hidrólise da minhoca, que reduz o número de experimentos, melhorando a qualidade da informação obtida e, conseqüentemente, diminui o trabalho, o tempo e o custo final. Optou-se em realizar um planejamento experimental completo para as cinco variáveis independentes em estudo: pH, temperatura, relação enzima/substrato, tempo de incubação e grau de agitação, a partir de uma estratégia 2^5 com 10 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, utilizando o *Software Statistica* versão 7.0, totalizando 45 testes de hidrólise para cada enzima, conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Valores das variáveis do planejamento experimental em estudo

pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Agitação (rpm)	Enzima/Substrato (%)
6,3	38	1,52	58	2,67
6,3	38	1,52	58	5,83
6,3	38	1,52	142	2,67
6,3	38	1,52	142	5,83
6,3	38	2,99	58	2,67
6,3	38	2,99	58	5,83
6,3	38	2,99	142	2,67
6,3	38	2,99	142	5,83
6,3	57	1,52	58	2,67
6,3	57	1,52	58	5,83
6,3	57	1,52	142	2,67
6,3	57	1,52	142	5,83
6,3	57	2,99	58	2,67
6,3	57	2,99	58	5,83
6,3	57	2,99	142	2,67
6,3	57	2,99	142	5,83
8,2	38	1,52	58	2,67
8,2	38	1,52	58	5,83
8,2	38	1,52	142	2,67
8,2	38	1,52	142	5,83
8,2	38	2,99	58	2,67
8,2	38	2,99	58	5,83
8,2	38	2,99	142	2,67
8,2	38	2,99	142	5,83
8,2	57	1,52	58	2,67
8,2	57	1,52	58	5,83
8,2	57	1,52	142	2,67
8,2	57	1,52	142	5,83
8,2	57	2,99	58	2,67
8,2	57	2,99	58	5,83
8,2	57	2,99	142	2,67
8,2	57	2,99	142	5,83
5,00	47,5	2,25	100	4,25
9,5	47,5	2,25	100	4,25
7,25	25,0	2,25	100	4,25
7,25	70,0	2,25	100	4,25
7,25	47,5	0,50	100	4,25
7,25	47,5	4,00	100	4,25
7,25	47,5	2,25	0	4,25
7,25	47,5	2,25	200	4,25
7,25	47,5	2,25	100	0,50
7,25	47,5	2,25	100	8,00
7,25	47,5	2,25	100	4,25
7,25	47,5	2,25	100	4,25
7,25	47,5	2,25	100	4,25

Fonte: Dos autores.

2.4 Preparo da amostra

As minhocas foram deixadas por 24 horas em repouso em água, e após foram lavadas em água e acondicionadas em sacos plásticos e estocadas em freezer comum a -10,5 °C, sendo descongeladas em refrigerador, a 6°C, 12 horas antes do uso. A amostra foi então moída em Mixer Black Britânia de 200 W e transferida para erlenmeyer (reator), onde foram adicionados 25 mL de solução tampão de fosfato de sódio monobásico e dibásico, de acordo com o pH desejado na proporção 1:1 (massa substrato:volume solução tampão). A quantidade da enzima, pH, tempo de incubação, temperatura e agitação do meio foi conforme planejamento experimental descrito anteriormente, sendo a variação das condições mínima e máxima, respectivamente, de: pH de 5,0 a 9,5, temperatura de 25 a 70 °C, tempo de incubação de 0,5 a 4 h, relação enzima/substrato (m/m) de 0,5 a 8,0% e agitação do meio de 0 a 200 rpm, baseados nos trabalhos de Schmidt (2008), Schmidt e Sallas-Mellado (2009), Rossi (2007), Hathwar et al. (2011) e Chae et al. (1998). As condições de temperatura e agitação da hidrólise foram controladas em Incubadora Refrigerada MA 830 Marconi.

Transcorrido o tempo de hidrólise predefinido, alíquotas de 1 mL do hidrolisado (triplicata) foram inativadas pela adição de 9 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 6,25%, sendo deixadas em repouso por cerca de 15 minutos. A seguir a amostra foi filtrada, sendo separado o líquido do sobrenadante, posteriormente a parte líquida (chamada hidrolisado) foi congelada até a realização da análise de teor de proteínas solúveis, utilizando o método de Lowry et al. (1951), no que foi estimado o grau de hidrólise como a porcentagem de proteínas solúveis em relação à quantidade de proteína total, que foi calculado a partir da equação:

$$\text{Grau de Hidrólise: } \frac{\text{Proteína final (hidrolisado)} - \text{Proteína inicial}}{\text{Proteína total da Amostra (por Kjeldahl)}}$$

Onde a proteína final corresponde à quantidade de proteína solúvel nas condições de hidrólise desejadas, a proteína inicial corresponde à quantidade de proteína solúvel imediatamente após a adição da enzima (inativadas com TCA 6,25%), e a proteína total corresponde à quantidade de proteína total na amostra determinada por Kjeldahl, utilizando-se fator de correção 6,25 que corresponde à proteína animal ($N \times 6,25$).

2.5 Análises físico-químicas

A matéria-prima teve sua composição físico-química determinada de acordo com a metodologia recomendada pela *Official Methods of Analysis* (AOAC) (2005):

- Proteínas: utilizando o método de Kjeldahl ($N \times 6,25$);
- Cinzas: método gravimétrico em mufla, aquecendo-se a amostra na temperatura de 550 – 600°C;
- Umidade: método gravimétrico em estufa, aquecendo-se a mistura a 105°C;
- Lipídios: método gravimétrico de extração a quente de lipídios utilizando extrator de Soxhlet.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Caracterizações físico-químicas da matéria-prima

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos para as análises de cinzas, umidade, proteína e lipídios da minhoca *Eisenia andrei*.

Tabela 2 – Composição físico-química da *Eisenia andrei*

Propriedade	% (base úmida)	% (base seca)	Desvio padrão
Umidade	86,54	-	0,01
Cinzas	0,83	6,17	0,01
Proteína	9,55	65	0,14
Lipídios	1,70	10	0,08

Fonte: Dos autores.

O valor de proteína encontrado de 9,55% na base úmida corresponde a aproximadamente 65%, se for considerada a base seca. Sendo assim, o valor encontrado está de acordo com Pereira (1997), que afirma que o valor de proteína, em minhocas, situa-se entre 60 a 70% (base seca).

O teor encontrado de lipídios de 1,7% na base úmida corresponde a cerca de 10%, se for considerada a base seca. Desse modo, o valor encontrado está de acordo com Pereira (1997), que afirma que o valor de lipídios, em minhocas, é de 9% (base seca).

Não existem dados na literatura em relação à umidade e cinzas da minhoca. Sendo assim não é possível comparar os resultados obtidos com outras pesquisas. No entanto, o valor de 6,17% (base seca) indica baixo teor de compostos inorgânicos, logo elevada quantidade de matéria orgânica.

3.2 Resultados do planejamento experimental de hidrólise de minhoca

3.2.1 Condição de hidrólise para *Flavourzyme*

A Tabela 3 mostra os valores dos graus de hidrólise obtidos com a enzima *Flavourzyme*.

Tabela 3 – Graus de hidrólise com a enzima *Flavourzyme* nas condições estudadas

pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Agitação (rpm)	Enzima/Substrato (%)	Grau hidrólise (%)
6,3	38	1,52	58	2,67	2,62
6,3	38	1,52	58	5,83	4,89
6,3	38	1,52	142	2,67	2,87
6,3	38	1,52	142	5,83	3,78
6,3	38	2,99	58	2,67	2,92
6,3	38	2,99	58	5,83	6,74
6,3	38	2,99	142	2,67	2,84
6,3	38	2,99	142	5,83	3,98
6,3	57	1,52	58	2,67	1,78
6,3	57	1,52	58	5,83	2,38
6,3	57	1,52	142	2,67	3,53
6,3	57	1,52	142	5,83	2,25

pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Agitação (rpm)	Enzima/Substrato (%)	Grau hidrólise (%)
6,3	57	2,99	58	2,67	1,55
6,3	57	2,99	58	5,83	4,23
6,3	57	2,99	142	2,67	3,34
6,3	57	2,99	142	5,83	1,29
8,2	38	1,52	58	2,67	3,54
8,2	38	1,52	58	5,83	3,68
8,2	38	1,52	142	2,67	1,93
8,2	38	1,52	142	5,83	1,51
8,2	38	2,99	58	2,67	4,02
8,2	38	2,99	58	5,83	3,90
8,2	38	2,99	142	2,67	4,48
8,2	38	2,99	142	5,83	2,64
8,2	57	1,52	58	2,67	3,31
8,2	57	1,52	58	5,83	5,50
8,2	57	1,52	142	2,67	6,85
8,2	57	1,52	142	5,83	3,27
8,2	57	2,99	58	2,67	3,77
8,2	57	2,99	58	5,83	2,13
8,2	57	2,99	142	2,67	4,11
8,2	57	2,99	142	5,83	1,70
5,00	47,5	2,25	100	4,25	2,49
9,5	47,5	2,25	100	4,25	1,08
7,25	25,0	2,25	100	4,25	2,08
7,25	70,0	2,25	100	4,25	2,51
7,25	47,5	0,50	100	4,25	2,03
7,25	47,5	4,00	100	4,25	1,81
7,25	47,5	2,25	0	4,25	5,33
7,25	47,5	2,25	200	4,25	5,31
7,25	47,5	2,25	100	0,50	2,74
7,25	47,5	2,25	100	8,00	2,85
7,25	47,5	2,25	100	4,25	3,93
7,25	47,5	2,25	100	4,25	2,73
7,25	47,5	2,25	100	4,25	2,33

Fonte: Dos autores.

Utilizando-se de programas estatísticos observou-se que o nível de significância das variáveis de hidrólise com a *Flavourzyme* foram superiores a 0,05, sugerindo-se que ela não é uma enzima eficiente para a obtenção de hidrolisados de minhoca. Além disso, os graus de hidrólise encontrados foram bastante baixos (máximo encontrado de 6,85%), bem inferiores ao relatado nos trabalhos de Centenaro, Piotrowicz e Prentice-Hernandez (2008), que obtiveram hidrolisados de frango e corvina com graus de hidrólise de 46,9% e 59,8% respectivamente; Salazar-Posada, Lopes-Padilla e Cano-Salazar (2012) que obtiveram hidrolisados enzimáticos de subprodutos bovinos, mais precisamente do extrato do osso, com o uso da *Flavourzyme* com grau de hidrólise de 20,2%.

Segundo Souisse et al. (2007), o tipo do substrato é um dos principais fatores que influenciam a hidrólise. Sendo assim, sugere-se que os resultados encontrados se devem ao tipo de substrato em estudo, visto que as propriedades físico-químicas dele são bastante diferenciadas das matérias-primas utilizadas em outros estudos, principalmente o elevado teor de umidade que é de 86,54%.

5 CONCLUSÃO

Com base no planejamento experimental e em programas estatísticos observou-se que a *Flavourzyme* contribuiu com uma quantidade relativamente baixa de hidrolisados de minhoca, com grau de hidrólise no máximo de 6,85%. Por isso, sugere-se o estudo de outras condições de hidrólise, bem como o estudo de novas enzimas para a obtenção do produto proposto.

REFERÊNCIAS

- ADLER, N. J. **Enzymic Hydrolysis of Food Proteins**. Editora, Elsevier. Publishers. Copenhagen, 1986. 427 p.
- A.O.A.C. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. **Association of Official Analytical Chemists.**, 18^a edition, v. 1-2, USA. 2005.
- BHASKAR, N. et al. **Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of catla (Catlacatla) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease**. *Bioresource Technology.*, 2008. v.99, p. 335-343.
- CAPOBIANGO, M. et al. **Extração química e enzimática das proteínas do fubá de milho**. *Ciência Tecnologia Alimentos*. Campinas: v. 26, p. 884-890, out.-dez. 2006.
- CENTENARO, G. S. et al. Efeito da concentração de enzima e de substrato no grau de hidrólise e nas propriedades funcionais de hidrolisados proteicos de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 7, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422009000700021&lng=p&nrm=iso>. Acesso em: 29 maio 2012.
- CENTENARO, G. S.; PIOTROWICZ, I. B.; PRENTICE, C. H. **Estudo comparativo da atividade antioxidante em hidrolisados protéicos de pescado e de frango**. XVII Congresso de Iniciação Científica. Universidade Federal do Rio Grande - Escola de Química e Alimentos. Rio grande: FURG, 2008.
- CHAE, H. J. et al. **Process development for the enzymatic hydrolysis of food protein: Effects of Pre-treatment and Post-treatments on Degree of Hydrolysis and Other Product Characteristics**. *Jornal Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 1998. v. 3, p. 35-39.
- FONKWE, L. G.; SINGH, R. K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymatic hydrolysis. **Process biochemistry**. v. 31, 1996. p. 605-616.
- JUN, S.Y. et al. **Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein**. *European food Research technology*. v. 219: p. 20 – 26. 2004. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/uch2uw11ufghkum2/>>. Acesso em: 12 mai. 2012.
- HATHWAR, S. C. et al. **Simultaneous recovery of lipids and proteins by enzymatic hydrolysis of fish industry waste using different commercial proteases**. *Biochem Biotechnol*, 2011. v.164: p. 115-124.
- KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Influência das condições de processo na cinética de hidrólise enzimática de carne de frango. **Ciência tecnologia alimentos.**, Campinas, v. 29, n. 3, Sept. 2009. Available from Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010120612009000300017&lng=e&nrm=iso>. Acesso em: 03 jun. 2012.
- LIU, X. et al. **Enzymatic technology and analysis of earthworm enzymatic hydrolysate**. *Freshwater Fisheries Research Center of Chinese Academy of Fishery Science, China: Wuxi 214081*, 2003.

LOWRY, O. H. et al. **Protein measurement with the folin phenol reagent.** Journal Biol. Chem., p. 265-275, 1951.

LUTZ, I. A. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2005. 1018 p. (Série A – Normas e Manuais Técnicos).

MARTINS, V. G.; COSTA, J. A.V.; PRENTICE-HERNANDEZ, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422009000100012&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 30 mai. 2012.

MINHOCÁRIO CASEIRO. **Conjunto Minhocário Caseiro.** Disponível em: <<http://www.minhocario.eco.br/>>. Acesso em: 28 mar. 2014

OLIVEIRA, M. S. R; FRANZEN, F.L; TERRA, N. N. **Utilização da carne mecanicamente separada de frango para a produção de hidrolisados proteicos a partir de diferentes enzimas Proteolíticas.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 35, n. 1, p. 291-302, jan./fev. 2014

PEREIRA, J. E. **Minhocas: manual prático sobre minhocultura.** São Paulo: Nobel, 1997. Disponível em: <<http://www.tocadoverde.com.br/minhocas-manual-pratico-de-minhocultura.html>>. Acesso em: 01 jun. 2012.

PIGOTT, G. M.; **Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products.** AVI Publishing Company: Westport, 1982.

RED WORM COMPOSTING. Disponível em: <<http://www.redwormcomposting.com/>>. Acesso em 28 mar. 2014.

ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. C. Efeito da Hidrólise Enzimática sobre Propriedades Funcionais de Caseína Bovina Coagulada pela Ação da Quimosina. **Ciência e tecnologia de alimentos.** v. 25 (3), p. 468 – 474, 2005.

ROSSI, D. M. **Utilização de carne mecanicamente separada de frango para produção de um hidrolisado protéico a partir de enzimas microbianas.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2007. 103 p.

SALAZAR-POSADA, C; LOPEZ-PADILLA, A; CANO-SALAZAR, J. A. Efeito do pH e a temperatura na hidrólise enzimática de subprodutos da indústria bovina. **Rev. Lasallista Investig.**, Caldas, v. 9, n. 2, Dec. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-44492012000200004&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 26 set. 2013.

SCHMIDT, C. G. **Hidrólise enzimática das proteínas de carne de frango.** Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande: FURG, 2008, 130 p.

SCHMIDT, C. G.; SALLAS-MELLADO, M. Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 5, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422009000500012&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 23 jun. 2012.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações.** 1. Ed. São Paulo: Varela, 1996. 517 p.

SOUISSI, N. et al. **Biochemical and functional properties.** Food Technology and Biotechnology. v. 45p. 187–194, 2007. Disponível em: <<http://www.ftb.com.br/45/45-187.html>> Acesso em: 03 jun. 2012.