



### III-062 - APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA IMOBILIZAÇÃO CELULAR

**Camilla Lima Cunha**<sup>(1)</sup>

Aluna do Curso de Graduação em Engenharia de Produção da Faculdade de Tecnologia da UERJ.

**Denise Celeste Godoy de Andrade Rodrigues**<sup>(1)</sup>

Engenheira Química pela Escola de Química/ UFRJ. Mestre em Biotecnologia Industrial pela Escola de Engenharia de Lorena/USP. Doutora em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica pela Faculdade de Farmácia/USP. Professora Adjunta do Curso de Engenharia de Produção da Faculdade de Tecnologia/UERJ. Professora do Mestrado em Química Ambiental do Programa de Pós-Graduação em Química/UERJ. Professora do Programa de Mestrado Profissional em Ensino de Ciências da Saúde e do Meio Ambiente/UNIFOA.

**Endereço**<sup>(1)</sup>: Rodovia Presidente Dutra km 298 (sentido RJ - SP) - Pólo Industrial - Resende - RJ Cep: 27.537-000 - Brasil - Tel: +55 (24) 3381-3839 ramal 223 - e-mail: denise.cgar@gmail.com

#### RESUMO

O uso de células imobilizadas tem sido amplamente estudado como proposta para se alcançar melhores valores de produtividade e eficiência de conversão em processos biotecnológicos, uma vez que possibilita a utilização de uma alta concentração celular no meio reacional e a possibilidade de reutilização dos biocatalisadores, o que auxilia na diminuição de custos do processo. Dentre os métodos de imobilização, a adsorção natural é considerada de fácil execução e, aliado ao uso de materiais lignocelulósicos como suporte de imobilização, torna o processo uma alternativa econômica e sustentável, graças à disponibilidade, biodegradabilidade e baixo custo do biosuporte. Neste trabalho avaliou-se a utilização da bucha vegetal, da serragem e da casca de coco verde na imobilização de células de *Sacharomyces cerevisiae*. Dos suportes analisados a bucha vegetal e a serragem apresentaram maior eficiência de imobilização. A casca de coco verde, embora tenha apresentado menor eficiência, também mostrou-se promissora para ser empregada na imobilização celular.

**PALAVRAS-CHAVE:** Resíduos agroindustriais, imobilização celular, casca de coco verde, bucha vegetal, serragem

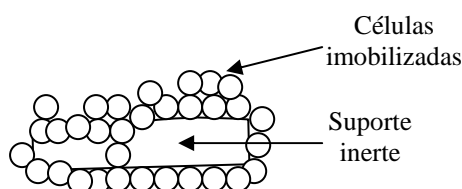
#### INTRODUÇÃO

Os resíduos provenientes das atividades agropecuárias e de processamento de produtos agropecuários, devido à grande concentração de material orgânico, têm proporcionado sérios problemas de poluição no solo, em águas superficiais e em águas subterrâneas. Além de possível contaminação direta, os maiores impactos provocados por resíduos sólidos orgânicos são decorrentes da fermentação do material, quando pode ocorrer a formação de ácidos orgânicos (chorume) com geração de maus odores e diminuição do oxigênio dissolvido em águas superficiais. O material orgânico é, também, habitat para proliferação de micro e macrovetores.

Além da preocupação ambiental, a destinação correta destes resíduos pode gerar produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários. De acordo com Pelizer et al. (2007) muitos estudos têm sido conduzidos visando o aproveitamento dos resíduos agroindustriais como insumos para indústria alimentícia, como substratos para bioconversão em outros produtos, como bioadsorventes no tratamento de efluentes. Pesquisas mostram que vários microrganismos podem ser utilizados no processo de bioconversão destes resíduos tais como a *Candida utilis*, *Lentinula edodes*, *Agaricus bisporus*, *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*, entre outros (BONATTI, 2007). O desenvolvimento de bioprocessos que resultam em produtos de alto valor agregado, entre os quais açúcares fermentáveis, combustíveis, alimentos, fármacos, enzimas e substâncias de interesse industrial (PANDEY et al., 2000; XAVIER-SANTOS, 2003; UENOJO et al., 2007), também tem atraído bastante a atenção para o uso de resíduos. Outra utilização destes resíduos na biotecnologia consiste em empregar estes materiais como suporte na imobilização celular ou em fermentações semi-sólidas (CARVALHO, CANILHA e SILVA, 2006; COVIZZI et al., 2007; PINTO et al., 2005).

Imobilização é o termo geral utilizado para descrever diferentes formas de fixação de células ou outras moléculas em materiais poliméricos ou naturais, que lhes serve de suporte. O uso de células imobilizadas tem sido considerado como uma alternativa para aumentar a produtividade global de fermentações, tradicionalmente realizadas com células em suspensão, uma vez que permite o trabalho com elevadas concentrações celulares no reator (RAMAKRISHNA e PRAKASHAM, 1999). Permite também a reutilização dos mesmos biocatalisadores por longos períodos estimulando processos contínuos, que podem reduzir os custos de produção (GAMARRA et al., 1988), além de poder aumentar a proteção das células contra inibidores e facilitar a separação dos biocatalisadores da fase líquida, onde os produtos de interesse estão presentes (CORCORAN, 1985).

As técnicas clássicas de imobilização celular podem ser classificadas em: naturais, as quais incluem a formação de biofilmes e a adesão/adsorção microbiana em suportes sintéticos ou naturais, e artificiais, as quais incluem a encapsulação em matrizes como alginato de cálcio ou uso de agentes ligantes (COVIZZI et al., 2007). O método de adsorção (Figura 1) em suportes para imobilização é utilizado pela sua simplicidade, baixo custo, fácil manipulação e grande diversidade de suportes. Há um potencial de equilíbrio entre as células adsorvidas e livres, dependendo do crescimento microbiano e da densidade de células na matriz, que normalmente é alcançado na fase exponencial de crescimento (COVIZZI et al., 2007).



**Figura 1: Adsorção de células em suporte inerte**

A facilidade de adsorção de células em qualquer material está relacionada aos poros existentes em sua superfície. Na tentativa de se obter maior eficiência de imobilização a aplicação de tratamentos físicos e químicos ao biosuporte é utilizada, como por exemplo, o tratamento com vapor (MOSIER et al., 2005).

Dentre os diversos resíduos da agroindústria brasileira, optou-se por estudar os seguintes: casca do coco verde, bucha vegetal e serragem. A utilização desses suportes para imobilização de células é uma alternativa de aproveitamento de resíduos agroindustriais que contribuirá para a expansão e diversificação desta tecnologia, além de trazer benefícios sócio-econômicos. A bucha vegetal mostrou-se eficiente como suporte em vários estudos (COELHO et al., 2007; LIU et al., 1998; OGBONNA et al., 1994). A casca de coco verde foi escolhida devido ao grande impacto ambiental, pois para cada 300 mL de água-de-coco consumidos, são gerados cerca de um quilo e meio de casca de coco. No Brasil, o consumo da água-de-coco gera cerca de 4 milhões de toneladas de casca/ano, transformando-se em um sério problema ambiental, principalmente para as grandes cidades (EMBRAPA, 2005). Em relação à serragem não se tem uma estimativa no Brasil da quantidade gerada anualmente. A indústria madeireira — serrarias e mobiliário — produz resíduos a partir do beneficiamento de toras, incluindo-se a serragem. No Brasil são geradas anualmente aproximadamente 2,9 milhões de toneladas de resíduos sólidos industriais, sendo 600 mil toneladas, um valor próximo de 22%, que recebem tratamento adequado (CORTEZ, LORA e GÓMEZ, 2008).

Neste trabalho foram estudadas condições de tratamento com vapor em autoclave dos resíduos citados – casca de coco, bucha vegetal e serragem. As condições avaliadas foram a pressão empregada e o tempo de exposição ao vapor, seguindo-se um planejamento fatorial  $2^2$ . Após cada tratamento os suportes foram empregados na imobilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* a fim de se avaliar a eficiência de imobilização celular por adsorção.

Este projeto foi desenvolvido nas instalações da Faculdade de Tecnologia da UERJ, campus Resende, como parte de um projeto à nível de iniciação científica.



## MATERIAIS E MÉTODOS

### Obtenção e secagem dos suportes

As cascas da banana, da cenoura e do coco foram cortadas em pedaços menores. Uma grande parte foi exposta ao sol até secar, durante 5 dias, e uma pequena parte secou na estufa à 70°C, durante 24 h. Depois foi utilizado o grau e o pistilo, para a obtenção de frações ainda menores, e armazenadas na geladeira.

A bucha vegetal permaneceu na estufa à 70°C até ficar bem seca, foi cortada em pedaços menores e armazenada. A serragem não precisou passar pelos procedimentos anteriormente citados, pois já se encontrava na granulometria desejada.

### Granulometria dos suportes

A análise granulométrica dos suportes foi realizada com 5 peneiras Série Tyler, indicadas na Tabela 1. Colocou-se no aparelho 50g de suporte, e deixou-se na frequência escolhida durante 5 minutos, pesando-se em seguida a massa retida em cada peneira.

Após esta análise, separou-se as frações com granulometria entre as séries Tyler 24 e 35 para a realização dos ensaios de imobilização celular.

**Tabela 1: Peneiras Série Tyler**

Peneira	tyler	d [mm]
1	24	0,71
2	28	0,59
3	35	0,42
4	60	0,25
5	65	0,21

### Tratamento dos Suportes

Antes da utilização dos resíduos como suportes é necessário fazer um tratamento a fim de aumentar a área superficial deste e também para se eliminar microrganismos infectantes presentes. Para isso, tomou-se como base o procedimento adotado por Coelho et al (2007), que trata a bucha vegetal em autoclave, a 1,5 atm por 35 min. Para se avaliar as condições de pressão e tempo de exposição do suporte em autoclave, utilizou-se o planejamento mostrado na Tabela 2. Para cada tratamento pesou-se 1,0 g de suporte seco em frasco erlenmeyer de 250 mL, devidamente tampado com rolha de algodão. Após o tratamento em autoclave, de acordo com as condições especificadas na Tabela 2, o frasco foi seco em estufa a 65 °C por 24 h. Os ensaios foram realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada empregando-se o programa STATGRAPHICS Centurion XV.II.

**Tabela 2: Planejamento do tratamento dos suportes**

ensaio	Pressão (atm)	Tempo (min)	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>
1	0,5	20	-1	-1
2	0,5	60	-1	+1
3	1,5	20	+1	-1
4	1,5	60	+1	+1
5	1,0	40	0	0
6	1,0	40	0	0
7	1,0	40	0	0

X<sub>1</sub> e X<sub>2</sub> são valores codificados para pressão e tempo, respectivamente

### Ensaio fermentativos para imobilização celular

O meio de cultivo utilizado possui a seguinte composição: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,2 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,2 g/L), extrato de levedo (1,0 g/L) e glicose (20,0 g/L). Como inóculo solubilizou-se 10g de fermento biológico seco instantâneo em 50 mL de água estéril. Mostrou-se necessário homogeneizar a mistura. As células foram imobilizadas por adsorção em bucha vegetal, casca de coco verde e serragem, tratados no início de cada fermentação, de acordo com o planejamento apresentado na Tabela 2.



As fermentações foram conduzidas para cada suporte em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 1,0 g de suporte tratado, 100 mL de meio de fermentação e 2mL do inóculo, sendo estes frascos mantidos em mesa agitadora sob agitação de 150 rpm a 30 °C, por 8 horas. Um experimento foi realizado sob as mesmas condições acima, porém, sem o suporte de imobilização para efeito de controle.

### Quantificação da massa de células imobilizadas

Após a fermentação os frascos contendo os suportes foram retirados da mesa agitadora, filtrados em papel de filtro de filtração média (poro: 0,028mm) e lavados com 50 mL de água destilada para retirada do suporte com as células imobilizadas. O filtrado foi em seguida submetido à filtração a vácuo por membrana de celulose de 45 µm de poro para determinação da concentração de células livres.

Antes da filtração foram pesados vidros de relógio com os papéis de filtro e placas de petri com as membranas. Após a filtração os papéis de filtro foram colocados sobre os vidros de relógio e as membranas sobre as placas de petri, e todos levados a estufa à 70°C, até peso constante (cerca de 12 h). A determinação da concentração de células livres e imobilizadas foi feita por gravimetria.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando se trabalha com material particulado é importante se conhecer a granulometria da matéria-prima, pois esta influencia diretamente nos processos de adsorção de células. A granulometria também é importante para se padronizar o material de trabalho. Após a análise granulométrica, separou-se as frações com granulometria entre as séries Tyler 24 e 35 para a realização dos ensaios de imobilização celular.

Foram realizados ensaios prévios de imobilização com os cinco suportes preparados a 1,5 atm por 35 min. Verificou-se que a grande umidade presente nas cascas de cenoura e de banana interferiram significativamente nas análises realizadas e ao mesmo tempo, apresentaram baixa adsorção das células nas condições utilizadas. Dessa forma, optou-se por estudar condições de tratamento apenas para a bucha vegetal, a serragem e a casca de coco verde. Os resultados obtidos estão apresentados em termos de percentual de células imobilizadas nos suportes em relação às células livres (Tabela 3).

**Tabela 3: Percentual de células imobilizadas nos suportes, de acordo com o tratamento empregado**

Ensaio	P (atm)	t (min)	% células imobilizadas		
			Bucha vegetal	Serragem	Casca do coco verde
1	0,5	20	94,22	85,99	45,00
2	0,5	60	98,99	98,89	55,41
3	1,5	20	97,09	92,69	49,19
4	1,5	60	99,67	92,12	50,10
5	1,0	40	96,53	93,58	46,13
6	1,0	40	95,87	93,57	45,67
7	1,0	40	95,20	93,08	46,20

$$\% \text{ células imobilizadas} = m_{\text{cel.im}}/m_{\text{cel.total}}$$

Observando-se a Tabela 3, verifica-se que os materiais mais eficientes para imobilização das células foram a bucha vegetal e a serragem, apresentando percentual de imobilização semelhante, para diferentes condições de tratamento. Para a bucha a melhor condição de tratamento correspondeu ao ensaio 4 (1,5 atm por 60 min), verificando-se 99,67% de imobilização. Já para a serragem a melhor condição correspondeu ao ensaio 2 (0,5 atm por 60 min), com 98,89 % de imobilização. A casca de coco verde também pode ser utilizada, sendo as condições do ensaio 2 as que forneceram melhores resultados. Este resíduo é bastante abundante no Brasil e tem sido explorado para diversas outras atividades. Estudar uma melhor técnica de tratamento deste suporte pode vir a trazer resultados mais promissores, já que este foi capaz de adsorver as células em sua superfície.

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente, empregando-se metodologia de superfície de resposta, a fim de se obter modelos que descrevessem as observações realizadas. Em relação à imobilização em serragem a análise estatística não pode ser realizada, pois não foi possível a diferenciação nos valores encontrados para o percentual de imobilização.



## Bucha Vegetal

Realizou-se a análise estatística para a bucha vegetal obtendo-se os resultados mostrados na Tabela 4 para a análise de variância. Observou-se que nenhum efeito foi significativo para a imobilização em bucha vegetal. O tempo de utilização da autoclave mostrou-se significativo apenas ao nível de 10% de probabilidade.

**Tabela 4: Análise de Variância para a imobilização celular em bucha vegetal**

Efeitos	SQ	GL	MQ	F	P
Pressão	3,15063	1	3,15063	1,75	0,2782
Tempo	13,5056	1	13,5056	7,48	0,0716**
Pressão*Tempo	1,19902	1	1,19902	0,66	0,4748
Resíduo	5,4159	3	1,8053		
Total	23,2712	6			

$R^2 = 76,727$

GL = graus de liberdade; SQ = soma quadrática; MQ = média quadrática

\*\*significativo ao nível de 10% de probabilidade ( $p < 0,10$ )

Uma nova análise foi realizada, retirando-se os efeitos Pressão e Pressão x Tempo, sendo os resultados apresentados nas Tabelas 5 e 6. O modelo proposto, dessa forma, é significativo ao nível de 95% de confiança. Entretanto o modelo só explica 58,0359% da variação que o tempo exerce sobre a imobilização celular. O gráfico dos resíduos para o modelo obtido (Equação 1) é mostrado na Figura 2.

**Tabela 5: Estimativa do efeito do tempo de autoclave sobre a imobilização celular**

Parâmetro	Coefficiente	Erro-padrão	P
CONSTANTE	96,7957	0,528219	0,0000
Tempo	1,8375	0,698768	0,0466*

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )

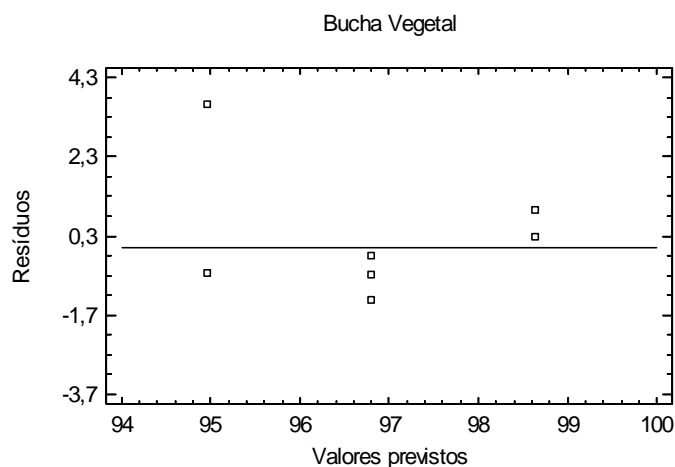
**Tabela 6: Análise de variância do modelo linear para a bucha vegetal**

Parâmetro	SQ	GL	MQ	F	P
Modelo	13,5056	1	13,5056	6,91	0,0466*
Erro	9,76555	5	1,95311		
Total (Corr.)	23,2712	6			

$R^2 = 58,0359$

GL = graus de liberdade; SQ = soma quadrática; MQ = média quadrática

\*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )



**Figura 2: Gráfico de resíduos para o modelo de imobilização da bucha vegetal**  
 $\%imob = 96,7957 + 1,8375.Tempo$  **Equação 1**

## Casca de Coco Verde

A mesma análise estatística foi realizada para a imobilização celular em casca de coco verde e os resultados são apresentados na Tabela 7. Como a pressão não mostrou-se significativa esta foi retirada do modelo. Os efeitos quadráticos da Pressão e do Tempo encontravam-se confundidos, segundo o programa utilizado. Realizaram-se duas novas análises excluindo-se um efeito quadrático de cada vez e obteve-se os resultados mostrados na Tabela 8.

O modelo proposto para a imobilização celular em casca de coco verde encontra-se na Equação 2. O gráfico de resíduos encontra-se na Figura 3 e a superfície de resposta é mostrada na Figura 4. A superfície mostrada na Figura 4 não possui um ponto de ótimo, mas indica que o melhor resultado pode ser obtido empregando-se o nível superior (+1) para o fator tempo e o nível mínimo para o fator pressão (-1). O ótimo obtido pelo modelo corresponde a 54,68% de imobilização celular.

**Tabela 7: Análise de Variância para a imobilização celular em casca de coco verde**

Efeitos	SQ	GL	MQ	F	P
Pressão	0,354025	1	0,354025	4,27	0,1747
Tempo	16,2812	1	16,2812	196,40	0,0051*
Pressão*Tempo	26,6772	1	26,6772	321,80	0,0031*
Pressão <sup>2</sup> + Tempo <sup>2</sup>	28,5717	1	28,5717	344,65	0,0029*
Resíduo	0,1658	2	0,0829	0,1658	
Total	72,0499	6			

R<sup>2</sup> = 99,7699

GL = graus de liberdade; SQ = soma quadrática; MQ = média quadrática

\*significativo ao nível de 5% de probabilidade (p<0,05)

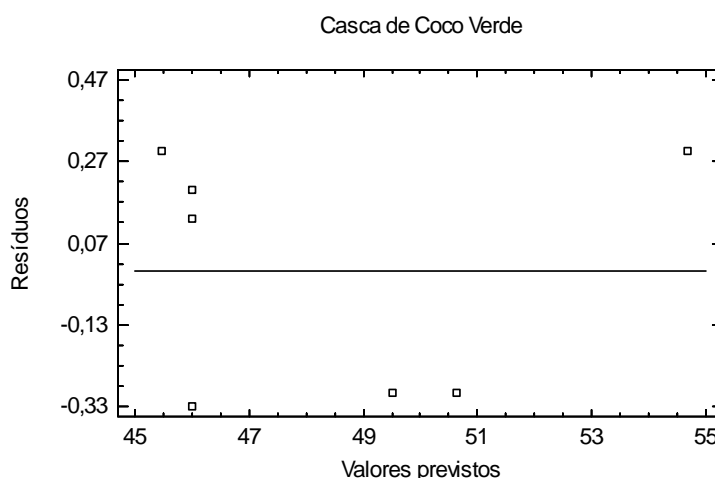
**Tabela 8: Análise de Variância para a imobilização celular em casca de coco verde**

Efeitos	SQ	GL	MQ	F	P
Tempo	16,2812	1	16,2812	93,96	0,0023*
Pressão*Tempo	26,6772	1	26,6772	153,96	0,0011*
Tempo*Tempo	28,5717	1	28,5717	164,89	0,0010*
Resíduo	0,519825	3	0,173275		
Total	72,0499	6			

R<sup>2</sup> = 99,2785

GL = graus de liberdade; SQ = soma quadrática; MQ = média quadrática

\*significativo ao nível de 5% de probabilidade (p<0,05)



**Figura 3: Gráfico de resíduos para o modelo de imobilização celular em casca de coco verde**  
 $\%imob = 46,0 + 2,0175 \cdot Tempo - 2,5825 \cdot Pressão \cdot Tempo + 4,0825 \cdot Tempo^2$  Equação 2





Observando-se os resultados, verifica-se que o efeito do tempo de utilização da autoclave tem uma influência maior que a pressão utilizada sobre a eficiência de imobilização. Ao se analisar a Tabela 3 inicialmente, a pressão parece ter uma influência semelhante ao do tempo, mas na análise estatística constatou-se que o efeito da pressão está relacionado com o tempo. De acordo com Santos et al. (2004) o processo de tratamento com vapor realizado em pressões mais brandas e por um período de tempo maior permite a ocorrência de alterações na superfície do material de forma a aumentar os sítios de adsorção para as células, o que possibilita uma maior eficiência de imobilização celular, que está de acordo com os resultados encontrados neste trabalho.

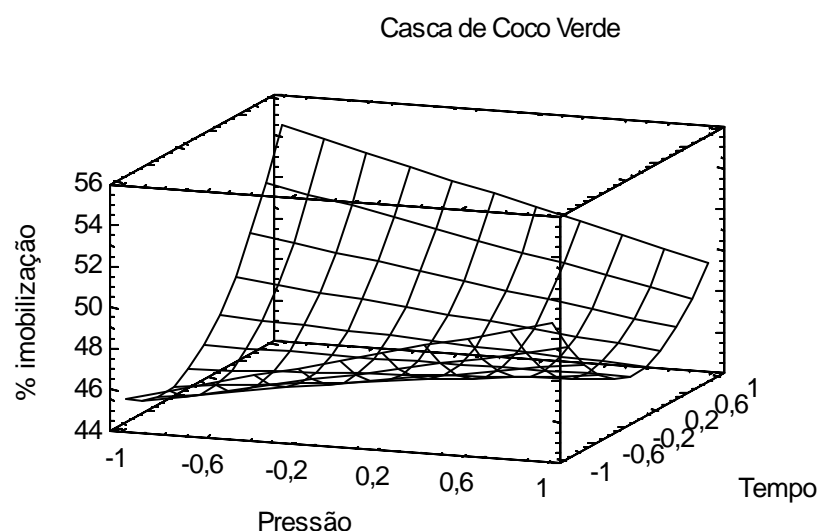


Figura 4: Superfície de resposta para a imobilização celular em casca de coco verde

## CONCLUSÕES

Embora não tenha sido possível obter um modelo estatístico para o processo de imobilização celular para a serragem, verificou-se que este suporte atinge alta eficiência de imobilização. Em relação à bucha vegetal e à casca de coco verde verifica-se pelos modelos obtidos que o fator que mais influenciou o processo de imobilização foi o tempo de exposição do suporte ao vapor em autoclave.

A casca de coco verde apresentou a menor eficiência de imobilização quando comparada aos outros suportes, mas devido às questões ambientais, seria interessante se testar outras técnicas de tratamento da casca de coco visando-se otimizar o processo.

Conclui-se que todos os suportes estudados podem ser aplicados para imobilização celular.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ, pela bolsa de apoio à graduação (BIG) concedida à aluna de iniciação científica.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CARVALHO, W., CANILHA, L, SILVA, S.S. Uso de biocatalisadores imobilizados: Uma alternativa para a condução de bioprocessos. Revista Analytica, n. 23, p. 60-70, Jun./Jul. 2006.
2. COELHO, T.G., VALÉRIO, O.A., FONSECA, R.R., SARROUH, B.F., SILVA, S.S. Produção Biotecnológica de Xilitol: Avaliação do Sistema Imobilizado em Bucha Vegetal por Sistema de Bateladas Repetidas. In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos- Sinaferm 2007, Curitiba, PFE0198, 2007.
3. CORCORAN, E. The production and use of immobilized living microbial cells. In: WISEMAN, A. Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology. England: Ellis Horwood. v.10, p.12-50, 1985.
4. CORTEZ, L.A.B., LORA, E.E.S., GÓMEZ, E.O. (organizadores) Biomassa para energia. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2008. 29p
5. COVIZZI, L.G., GIESE, E.C., GOMES, E., DEKKER, R.F.H., SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. Seminário: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 28, n.2, p. 143-160, jul./dez. 2007
6. EMBRAPA. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2005/dezembro/foldernoticia.2005-11-03.2029865218/dia-de-campo-na-tv-divulga-tecnologia-para-aproveitamento-da-casca-de-coco-verde/?searchterm=coco>>. Acesso em 20 fev. 2005.
7. GAMARRA, JAG. Produção de etanol em batelada repetida com reciclo celular completo usando um reator catalítico agitado tipo cesta com leveduras imobilizadas. Dissertação de Mestrado -Mestrado em Engenharia- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.
8. LIU, Y. K.; SEKI, M.; TANAKA, H.; FURUSAKI, S. Characteristics of Loofa (*Luffa cylindrica*) Sponge as a carrier for plant cell immobilization. Journal of Fermentation and Bioengineering, v.85, n.4, p.416-421, 1998.
9. MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M., LADISCH, M., Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, n.96, p.673-686, 2005.
10. OGBONNA, J. C.; LIU, Y. C.; LIU, Y. K.; TANAKA, H. Loofa (*Luffa cylindrica*) Sponge as a carrier for microbial cell immobilization. Journal of Fermentation and Bioengineering, n.78, p.434-442, 1994.
11. PANDEY, A., SOCCOL, C. R., MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: bioprocesses and products. Process Biochem., v.35, p.1153-1169, 2000.
12. PINTO, G. A. S., BRITO, E. S., ANDRADE, A. M. R., FRAGA, S. L. P., TEIXEIRA, R. B. (2005) Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. Comunicado técnico on-line 102. Disponível em: <[www.cnpat.embrapa.br/home/down/index.php?pub/cot\\_102.pdf](http://www.cnpat.embrapa.br/home/down/index.php?pub/cot_102.pdf)>. Acesso em: 21 mar. 2007.
13. RAMAKRISHNA, SV; PRAKASHAM, RS. Microbial fermentations with immobilized cells. Current Science. v.77, p.87-100, 1999.
14. SANTOS, J., CASTRO, A. L. A., PAIVA, P. C. A, BANYNS, V. L. Efeito dos tratamentos físicos e químicos no resíduo de lixadeira do algodão. Ciência e Agrotecnologia, v.28, n., p. 919-923, 2004.
15. UENOJO, M.; PASTORE, M.G. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. Química Nova, v.30, n.2, p. 388-394, 2007.
16. XAVIER-SANTOS, S. Diversidade, isolamento em cultura e perfil enzimático de fungos decompositores de madeira da estação ecológica do Noroeste Paulista – São José do Rio Preto / Mirassol, SP. Rio Claro, 2003. Tese de Doutorado – UNESP, 222p, 2003.