

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

**CAMILA DA SILVA
FELIPE ALVES DOS SANTOS**

**EMPREGO DA CASCA DE BANANA NA
PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS FÚNGICAS DE
INTERESSE BIOTECNOLÓGICO**

BAURU
2016

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

**CAMILA DA SILVA
FELIPE ALVES DOS SANTOS**

**EMPREGO DA CASCA DE BANANA NA
PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS FÚNGICAS DE
INTERESSE BIOTECNOLÓGICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob orientação da Prof^ª. Dra. Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes.

**BAURU
2016**

Silva, Camila da

S5862e

Emprego da casca de banana na precipitação de proteínas fúngicas de interesse biotecnológico / Camila da Silva; Felipe Alves dos Santos.-- 2016.

38f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina)
- Universidade do Sagrado Coração - Bauru – SP

1. Casca de banana. 2. *Aspergillus niger*. 3. Proteína. I. Santos, Felipe Alves dos. II. Queiroz-Fernandes, Geisiany Maria de. III. Título.

**CAMILA DA SILVA
FELIPE ALVES DOS SANTOS**

**EMPREGO DA CASCA DE BANANA NA
PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS FÚNGICAS DE
INTERESSE BIOTECNOLÓGICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob orientação da Prof^a. Dra. Geisiany Maria de Queiroz Fernandes.

Banca examinadora:

Prof^a. Dra. Eliane Maria Ravasi Stefano Simionato
Universidade do Sagrado Coração

Bruna Letícia Martins
Mestranda em Ciência e Tecnologia Ambiental
Universidade do Sagrado Coração

Prof^a. Dra. Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 24 de outubro de 2016.

Dedicamos este trabalho a nossos pais que nos apoiaram e não mediram esforços para que alcançássemos nossos sonhos e objetivos, e principalmente a Deus, que iluminou cada passo que demos até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que permitiu que tudo acontecesse, me dando forças para não desistir, superando meus medos e me fazendo acreditar que todos os meus sonhos são possíveis.

À Prof^a. Dra. Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes, que com muita paciência, inteligência e força de vontade nos ajudou a tornar possível a conclusão do mesmo. Uma professora fantástica, que será meu espelho de caráter e determinação.

À Universidade do Sagrado Coração (USC), que me ajudou a concluir meu sonho, devido a minha bolsa de estudos, que sem ela não seria possível.

Às funcionárias Fabiane e Lígia do laboratório de Biociências da USC, que sempre estão prontas para nos ajudar com muita eficiência e todo suporte fornecido durante as práticas e ao Prof. Ms. Fernando Tozze Alves Neves que nos auxiliou nos passos iniciais de preparação do pó da casca de banana.

A todos os professores pelo apoio durante todos estes anos e contribuições para minha formação.

A todos que me ajudaram ou contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Aos meus amigos, pelo companheirismo, carinho e amizade, por suportarem minhas crises de ansiedade, choros e muito desespero. Em especial a meu amigo Felipe Santos, meu companheiro de trabalho, sem ele não seria possível finalizar este trabalho, agradeço-o por estar comigo em todos os momentos da minha vida, pois sua amizade é essencial para mim.

Agradeço com todo meu amor e carinho a minha mãe Marilyn, pois sem ela nada disso seria possível, todos os meus sonhos são os dela e vice-versa. Minha guerreira, minha rainha, que com toda sua sabedoria me mostra que com humildade e amor é possível conquistar o mundo.

Camila da Silva

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar os meus passos, iluminar minha mente e sempre estar comigo, porque sem Ele eu não seria nada.

À Prof^a. Dra. Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes, que com paciência e fôlego, conseguiu corrigir os meus textos (foram vários) e por ser uma excelente professora e profissional, na qual sempre me espelharei.

À Universidade do Sagrado Coração por contar com excelentes profissionais que sempre contribuíram para minha formação.

A todos os professores que contribuíram direta ou indiretamente com minha formação acadêmica na ministração de aulas, e pessoal uma vez que ao longo desta jornada criamos vínculos acima de tudo de amizade.

À Ligia e Fabiane do laboratório de Biociências que sempre agiram com grande destreza e eficiência e me ensinaram e ajudaram em diversos momentos e ao Prof.Ms. Fernando Tozze Alves Neves pelo apoio e suporte com os equipamentos de obtenção do pó da casca de banana.

A todos os colegas de sala, que hoje posso chamar de colegas de profissão, e que tenho certeza que sem exceção, serão excelentes profissionais e cidadãos.

Aos meus pais Valdirene, Benedito e irmã Ana Laura, agradeço de todo meu coração, por não medirem esforços para me apoiar na conquista de mais este sonho. Agradeço ainda a todos os demais familiares que sempre me ajudaram e estiveram comigo.

Felipe Alves dos Santos

“Queira... Basta ser sincero e desejar profundo, você será capaz de sacudir o mundo.” (Raul Seixas)

RESUMO

Biотecnologia é a ciência que desenvolve técnicas utilizando sistemas biológicos para gerar processos de interesse a diversas áreas, sempre se preocupando com melhorias ao meio ambiente. Deste modo, estudos buscando utilizar a banana, por ser uma das frutas mais populares do mundo e possuir um dos maiores índices de consumo, na tentativa de encontrar aplicação para as cascas residuais e cujo acúmulo gera grandes problemas ambientais, têm grande relevância. Este resíduo vem sendo empregado para diversas finalidades, dentre elas para a produção de biogás pela fermentação de lignocelulose oriunda da casca, remoção de urânio e outros metais pesados de solo e água por interação de cargas, pois elas são carregadas negativamente, enquanto metais pesados são carregados positivamente, causando assim atração de ambas as cargas e a formação de compostos que, posteriormente, podem ser desorvidos, processo que separa a casca do metal para reutilizá-lo. Diante disso, este estudo buscou verificar a capacidade de precipitação de proteínas, utilizando cascas de banana nanica (*Musa cavendish*) uma vez que, a maioria das proteínas possuem cargas positivas e são extremamente importantes para os processos biotecnológicos como, por exemplo, as enzimas. As cascas de banana foram submetidas à secagem em estufa de circulação de ar forçada a 60°C e posteriormente, foram trituradas em moinho de facas. Em seguida, realizou-se a granulometria, sendo empregados grânulos finais com 0,35 mm. Foram realizadas produções de proteína fúngica por *Aspergillus niger*, em triplicadas, e essas foram então submetidas à precipitação pelo pó obtido, sob refrigeração e agitação constante. Visou-se precipitar entre 20 a 30% das proteínas. Após a precipitação, centrifugaram-se as amostras e dosaram-se as proteínas pelo método de Bradford. Os resultados foram satisfatórios, com melhor concentração de 0,070 mg/mL. Estes dados podem contribuir para a redução de custos na obtenção de produtos biotecnológicos com alto grau de pureza e ainda para a redução do acúmulo de resíduos ambientais.

Palavras-chave: casca de banana; *Aspergillus niger*; proteína.

ABSTRACT

The biotechnology is the science that develops techniques using biological systems to generate processes of interest to many areas, always worrying about improvements to the environment. Therefore, studies searching to use the banana, for being one of the most popular in the world and has one of the highest rates of consumption, in an attempt to find application for the peel and whose accumulation causes environmental problems, have great relevance. This residue has been used for several purposes, including for biogas production by fermentation of lignocellulose derived from the peel, removal of uranium and other heavy metals from soil and water by interaction of loads, because they are negatively charged, while metals are positively charged, thus causing attraction of both loads and the formation of compounds, which subsequently can be desorbed, process that separates the peel of metal to reuse it. Thus, this study aimed to verify the ability of protein precipitation, using peel of banana (*Musa cavendish*) since the majority of proteins have positive charges and are extremely important for the biotechnological processes as, for example, the enzymes. The peel of banana were submitted to kiln-drying of air circulation forced to 60°C and subsequently, were crushed in mill of knives. Then, the particles size were measurement, using final granules with 0.35 mm. The production of fungal protein was realized with *Aspergillus niger*, in tripled and these were submitted to the precipitation by powder obtained, between 20 to 30% concentration, under cooling and constant agitation. After the precipitation, the samples were centrifuged and measured the proteins by the method of Bradford. The results were satisfactory, with better concentration of 0.070 mg/mL. These data may contribute to the reduction of costs in obtaining biotechnological products in high degree of purity and even for the reduction in the accumulation of environmental waste.

Keywords: banana peel; *Aspergillus niger*; protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Escala de maturação de Von Loeseck.....	19
Figura 2: Estufa de circulação de ar, onde as cascas de banana foram secas.....	19
Figura 3: Etapas de trituração da casca de banana para obtenção do pó.....	20
Figura 4: Armazenamento do pó das cascas de banana.	21
Figura 5: Agitador com tamizes.	22
Figura 6: Diferenças granulométricas do pó da casca de banana após a tamisação. Em A: menores que 0,35 mm, em B: maiores que 0,35 mm e em C: maiores que 0,50 mm	22
Figura 7: Amostras de proteínas 1, 2 e 3 a serem precipitadas	25
Figura 8: Precipitação sob agitação e temperatura constantes	25
Figura 9: Tubos de diálise em solução tampão de acetato de sódio com pH 5,0	26
Figura 10: Fluxograma das etapas de obtenção do pó da casca de banana e precipitação de proteínas fúngicas	27
Figura 11: Concentração média de proteínas após a precipitação	30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	PROCESSOS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS	13
2.2	ENZIMAS	15
2.3	PROPRIEDADES DA CASCA DE BANANA	15
3	OBJETIVOS	18
3.1	OBJETIVOGERAL	18
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4	MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1	AQUISIÇÃO DAS BANANAS	19
4.2	SECAGEM	19
4.3	TRITURAÇÃO	20
4.4	ARMAZENAMENTO DO PÓ OBTIDO	20
4.5	GRANULOMETRIA	21
4.6	MICRO-ORGANISMO	22
4.7	CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO	23
4.8	PRODUÇÃO DA PROTEÍNA FÚNGICA	23
4.9	RECUPERAÇÃO DA PROTEÍNA	23
4.10	DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE EXTINÇÃO MOLAR	23
4.11	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	24
4.12	PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO TAMPÃO	24
4.13	PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS	24
4.14	DOSAGEM DA PROTEÍNA APÓS A PRECIPITAÇÃO	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia é empregada desde os primórdios da humanidade, antes mesmo do homem compreendê-la. Os povos egípcios, por exemplo, empregavam técnicas de produção de pães, vinho e cerveja que utilizavam processos fermentativos, no decorrer histórico com a evolução das ciências e após a agregação de novos estudos, observou-se o surgimento da biotecnologia moderna, que passou a empregar a técnica do DNA recombinante, trazendo assim mudanças radicais nas possibilidades de técnicas empregadas em áreas distintas como saúde, indústrias alimentícias e outros, gerando também novas atividades econômicas (BORÉM e ALUÍZIO, 2005; BIANCHI, 2013).

Os avanços biotecnológicos mais incríveis ocorreram a partir de meados de 1940 com a descoberta dos antibióticos, seguido da revolução verde na agricultura na década de 1950, que acarretou um enorme progresso na compreensão da base genética das células vivas, viabilizando o desenvolvimento de novos produtos e processos úteis para a vida em geral. Estes avanços sempre buscaram contribuir para o meio ambiente e para a saúde humana. (ADB, 2001).

As proteínas são substâncias essenciais, macromoleculares, compostas pela interação química entre aminoácidos, constituídos por um grupo carboxílico e um grupo amino. São substâncias complexas, de elevado peso molecular, com ligações principalmente peptídicas. Além de serem importantes substâncias estruturais, como por exemplo, o colágeno, possuem ainda outras funções biológicas importantes como, por exemplo, de defesa, atuando ainda como enzimas, hormônios, neurotransmissores, transportadores através das membranas celulares (ARAÚJO et al., 2002; LICHTIG et al., 2001).

As proteínas que atuam como enzimas são catalisadores biológicos em reações bioquímicas com papel fundamental no controle metabólico, uma vez que, aceleram as reações, sendo extremamente versáteis e por isso representam um importante produto biotecnológico que sob o ponto de vista industrial, apresentam características ótimas em relação aos catalisadores químicos, pois produzem produtos específicos, não permitindo formação de co-produtos (RIBEIRO et al., 2013). Além disso, devido aos problemas ambientais, muitos processos químicos em diferentes indústrias estão sendo substituído por enzimas, sendo atualmente empregadas em diferentes setores como indústria têxtil, farmacêutica, petróleo, purificação de águas residuárias, detergentes, branqueamento de polpa

de celulose e alimentícia(SAID et al., 2004; BARREDO, 2005; TREICHEL et al., 2010;WANDERLEY et al., 2011; MONTIBELLER, 2012).

As enzimas encontram também aplicações na área da saúde, sendo empregadas na terapêutica, como para tratar ou curar doenças como fibrose cística, distúrbios cardíacos e no diagnóstico de outras tantas (CIB, 2016).

Se a enzima é excretada, as etapas de obtenção seguem uma linha diferente daquele em que não é, ou seja, intracelular. Para a enzima intracelular, é necessário romper as estruturas celulares do micro-organismo, sendo importante escolher uma técnica para que haja a correta liberação. Para o emprego na saúde é necessário realizar etapas de purificação, isto é, separar a enzima e purificá-la, atentando-se ainda aos aspectos fisiológicos e citológicos do micro-organismo em questão, avaliando tanto a geração quanto a localização da mesma. Estas etapas envolvem o isolamento primário da enzima que se dá pela extração por solventes, precipitação e ultracentrifugação (MONTEIRO et al., 2009).

O processo de purificação destina-se especialmente para remoção de impurezas. Pode-se optar pelos vários tipos de cromatografia, adsorção ou a precipitação fracionada. A última etapa, o isolamento final, compreende-se pela formulação final ou comercialização direta. Pelo fato de as técnicas de purificação enzimática envolverem um processo minucioso e de elevado custo, o produto final também tem seu preço elevado no mercado (MONTEIRO et al., 2009; SAID et al., 2004). Diante disso, estudos que busquem novas técnicas de precipitação de proteínas com consequente redução de custos são interessantes sob o ponto de vista biotecnológico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROCESSOS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS

Proteínas são polímeros constituídos por aminoácidos em ligações covalentes peptídicas. Estes polímeros naturais são macromoléculas abundantes em nosso organismo e apresentam diversas funções biológicas, funções estas, que são dependentes de seu arranjo espacial, ou seja, sua estrutura tridimensional (SANTOS et al., 2008).

As características de uma proteína dependem mais da sequência de aminoácidos do que de sua composição, as quais se classificam de acordo com seu grupo R (cadeia lateral). Os aminoácidos que constituem as proteínas podem ser apolares, polares sem carga, polares ácidos ou básicos. Os apolares não possuem capacidade de receber ou doar elétrons, não participam de ligações iônicas e também não realizam pontes de hidrogênio e são oleosos, por exemplo: glicina, alanina, valina, prolina, leucina, metionina e isoleucina. Os polares sem carga apresentam carga nula quando em pH neutro e podem realizar pontes de hidrogênio, exemplos: serina, treonina, cisteína, asparagina e glutamina. Muitas proteínas têm ainda em sua composição íons metálicos como Zn^{2+} e Ca^{2+} (CAVALCANTE et al., 2015; VOET et al., 2014).

Todos os 20 aminoácidos encontrados nas proteínas tem um grupo carboxila e um grupo amino ligados ao mesmo átomo de carbono. Eles se diferenciam uns dos outros através de suas cadeias laterais ou grupos R, os quais variam em estrutura, tamanho e carga elétrica, e influenciam a solubilidade do aminoácido em água. O grupo R carregado negativamente (ácidos) estão associados com o pH 7,0 são os aspartato e o glutamato, já o grupo R carregado positivamente (básicos), em pH 7,0 são lisina, arginina, histidina (único aminoácido com pK_a próximo da neutralidade) (LEHNINGER et al., 1995).

Para que haja a precipitação da proteína, é ideal atingir o seu ponto isoelétrico, ou seja, é o valor de pH onde a molécula apresenta carga elétrica líquida igual a zero. Em suma, ponto isoelétrico é o pH onde há equilíbrio entre as cargas positivas e negativas dos grupamentos iônicos da proteína (ROBYT et al., 2000; VOET et al., 2014).

Porém, existem outros fatores que influenciam na propriedade física das proteínas, tais como a ação de bases, ácidos, solventes orgânicos e sais, pode-se incluir ainda a temperatura como um dos agentes que podem ser utilizados (ROBYT et al., 2000).

A precipitação de proteínas por adição de sais neutros, conhecido também como efeito da força iônica, tem como princípio a adição de sais neutros em uma solução, onde ocorre o aumento da força iônica do sistema, ou seja, ao adicionarmos quantidades pequenas de sal em uma solução contendo proteínas, as cargas provenientes da dissociação salina interagem com as moléculas proteicas, diminuindo sua interação, causando aumento de solubilidade no meio aquoso, o sulfato de amônio é um exemplo desse sal, sendo ele o mais empregado em técnicas de precipitação por sais neutros (ZAIA et al., 1998; FENGXIA et al., 2008).

O método de precipitação de proteína por sais de metais pesados, ácidos fortes e cátions de metais pesados como Zn^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} e Hg^{2+} formam precipitados insolúveis de proteínas, que são denominados dependendo do elemento formador, por exemplo, proteinato de chumbo, precipitação esta que é mais intensa quando o pH está acima do ponto isoelétrico. Sendo assim, impossível precipitar proteína de baixo ponto isoelétrico dessa forma, porém pode-se fazer adição de ácidos fortes, nesta devido ao baixo ponto isoelétrico, a carga líquida total é positiva, facilitando interação da molécula com os ânions provenientes de ácidos como pírico, fosfotungústico e tungústico (ZAIA et al., 1998).

Precipitação por ação do calor ocorre devido a desnaturação proteica, ou seja, as proteínas possuem conformação tridimensional que é relativamente sensível ao calor, que quando é incidido causa desorganização das cadeias peptídicas, alterando a conformação dimensional, o que leva a diminuição de sua solubilidade e à sua precipitação (ZAIA et al., 1998).

Adição de solventes orgânicos em solução que contém proteína também é uma forma de realizar sua precipitação, porém a solubilidade das proteínas é menor do que em água, pois a capacidade da interação com as partículas do soluto é diferente para cada solvente. Isso ocorre porque a constante dielétrica, grandeza que mede interação do solvente com o soluto, é baixa. Sendo assim, a precipitação por solventes orgânicos é dependente da temperatura. Quando há solvente orgânico e temperatura elevada desnatura a proteína por rompimento das pontes de hidrogênio e estabelece ainda as interações polares, quando há solvente orgânico e temperatura baixa haverá separação de misturas de proteína e não sua precipitação (ZAIA et al., 1998).

2.2 ENZIMAS

Enzimas são proteínas que atuam como catalisadores em reações, sendo essenciais para o sistema metabólico de diversos organismos e possuem um papel fundamental na degradação da matéria orgânica, na infecção do hospedeiro e deterioração dos alimentos. Possuem estrutura molecular complexa, constituída principalmente por uma parte proteica que pode estar integrada a outras moléculas (ORLANDELLI, 2012; SPIER et al., 2005). São utilizadas para o desenvolvimento de metodologias analíticas, na fabricação de produtos biotecnológicos e no tratamento de resíduos. São bastante versáteis, não requerem altas temperaturas e valores extremos de pH e executam uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido, o que as torna altamente desejáveis. Geralmente, os processos industriais que empregam enzimas são relativamente simples, fáceis de controlar, eficientes energeticamente e requerem investimentos de baixo custo (ORLANDELLI, 2012).

Porém as enzimas de uso terapêutico requerem uma purificação de alta seletividade acoplada à preservação da atividade enzimática, evitando a desnaturação proteica e a proteólise. Devem ser considerados para o uso de enzimas com fins terapêuticos, dentre eles a baixa resposta imunológica, alta atividade e estabilidade em pH fisiológico, baixa taxa de eliminação e independência de cofatores exógenos. Além disso, quando se utilizam micro-organismos como fonte destas moléculas, deve-se buscar cepas não patogênicas objetivando evitar a presença de toxinas(ZIMMER, 2009).

A purificação muitas vezes é um dos passos mais importantes da obtenção enzimática, devendo levar em consideração quais suas aplicações para verificar os níveis de purificação, uma enzima empregada na saúde humana por exemplo, precisa de muitas técnicas de purificação do que uma que será usada na indústria têxtil, conseqüentemente quanto mais alta a pureza da enzima, mais caro é o processo de purificação, o qual pode representar cerca de 80% dos custos finais do produto (GOLUNSKI, 2014).

2.3 PROPRIEDADES DA CASCA DE BANANA

A bananeira do gênero *Musa*, pertence à família das Musaceae e é originária do continente Asiático, sendo também reconhecidos outros centros de origem secundários na África e nas ilhas do Pacífico. Uma das principais características fisiológicas da bananeira é a presença do “falso” tronco, formado pelas bainhas das folhas superpostas. O caule da

bananeira é na verdade um rizoma subterrâneo, e os “frutos”, as bananas, tratam-se de pseudobagas que é um tipo de pseudofruto que se encontra em algumas espécies vegetais que possuem o chamado “ovário interno” ao contrário das bagas verdadeiras (SENA, 2011).

A banana nanica pertence ao subgrupo Cavendish, cujos frutos são delgados, longos e encurvados, além de apresentar paladar muito doce quando maduros. Este subgrupo se originou por mutações do cultivo Pisang Masak Hiajau ou Lactan (ALVES et al., 1995).

A banana é uma das frutas mais populares do mundo. Consumida em todas as regiões do globo, é a fruta símbolo dos países tropicais. Além do sabor, são vários os atrativos nutricionais de estímulo ao seu consumo, é rica em vitaminas A e C, além de fibras e potássio (SENA, 2011).

Existe no Brasil a Associação Brasileira de Tratamento de Resíduos Sólidos (ABETRE) que classifica estes resíduos de acordo com a NBR 10.004:2004, deste modo, todo resíduo produzido por indústrias tem um destino correto a ser submetido (ABNT, 2004).

Com esta normativa, visando a diminuição dos problemas ambientais, as indústrias que utilizam as frutas para produção de sucos ou outros produtos, tendo então as cascas como resíduos necessitam por sua vez, de um investimento, que pode ser elevado para estar de acordo com a ABETRE (ABNT, 2004).

Cascas de bananas geralmente são descartadas, utilizadas na alimentação animal, ou eventualmente utilizadas na compostagem. O descarte dessas cascas causa problemas ambientais como o acúmulo de resíduos orgânicos e atualmente, existem poucos trabalhos na literatura mencionando o aproveitamento destes resíduos (BONIOLLO et al., 2008; ROSSO, 2009).

De acordo com as necessidades humanas, diversos compostos são produzidos e comercializados diariamente. Porém, a produção de resíduos tóxicos e radioativos também aumenta, isto é, a produção supre as necessidades humanas, mas gera impacto ambiental devido a resíduos contaminantes. Pesticidas, agrotóxicos, defensivos agrícolas e fertilizantes também são compostos que geram danos ambientais, como contaminação das águas (ABBAS, 2013).

Cascas de banana foram caracterizadas e aplicadas como biossorventes para remoção de urânio, segundo os autores, isso aconteceu porque as cascas de banana possuem cargas negativas atraindo para si íons de cargas positivas como os metais pesados. Observaram que a partir de dados obtidos neste estudo que a utilização da casca de banana como adsorvente reduz o impacto ambiental de diferentes maneiras, a biomassa residual acumulada no local

onde é gerada é retirada ou depositada em águas residuárias para serem tratadas com a biomassa produzida, e os metais pesados que são recuperados pela adsorção através da dessorção podem ser reaproveitados (BONIOLO et al., 2008).

Há estudos ainda que empregam as casacas de bananas com outras finalidades, como na produção de etanol, no tratamento de efluentes contaminados com fármacos poluentes, remoção de corantes têxteis em águas residuárias (COIMBRA, et al., 2015; BELISÁRIO et al., 2009; SOUSA et al., 2015).

As cascas de banana vêm sendo empregadas também para a produção de biogás pela fermentação de lignocelulose oriunda da casca. Cascas de banana nanica foram ainda utilizadas como adsorvente do cromo, por serem irregulares e possuírem camadas sobrepostas de fibras favoreceram a aderência dos íons metálicos presentes em solução aquosa (SOUZA et al., 2010, SILVA et al., 2011).

Neste contexto, este estudo buscou verificar se o pó da casca de banana nanica seria capaz de precipitar proteínas de maneira eficaz, uma vez que ambas podem sofrer interações de cargas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi verificar a capacidade da casca de banana nanica (*Musa cavendish*) em precipitar proteínas fúngicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adquirir os frutos comercialmente para obter as cascas de banana;
- Produzir as proteínas fúngicas;
- Secar as cascas de banana;
- Triturar as cascas de banana;
- Realizar a granulometria do pó obtido;
- Precipitar as proteínas;
- Dosar as proteínas antes e depois da precipitação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AQUISIÇÃO DAS BANANAS

As bananas nanicas (*Musa Cavendish*) foram adquiridas no comércio local, na cidade de Bauru, no primeiro semestre de 2016. Com coloração amarela com áreas marrons, numeração 7 de acordo com a escala de maturação de Von Loeseck (Figura 1).



Figura 1: Escala de maturação de Von Loeseck

Fonte: Delfino et al., 2016

4.2 SECAGEM

Para a secagem das cascas de banana utilizou-se estufa de circulação de ar forçada (Will), a 60°C durante 48 horas (Figura 2).



Figura 2: Estufa de circulação de ar, onde as cascas de banana foram secas

Fonte: Elaborado pelos autores

4.3 TRITURAÇÃO

Realizou-se a trituração das cascas após a secagem em moinho de facas (Tecnal), estas foram picadas previamente em pedaços menores e colocadas cuidadosamente no funil do aparelho e com auxílio de um bastão de plástico até as lâminas para uma melhor obtenção do pó, conforme demonstrado na Figura 3.



Figura 3: Etapas de trituração da casca de banana para obtenção do pó.

Fonte: Elaborado pelos autores.

4.4 ARMAZENAMENTO DO PÓ OBTIDO

Após a trituração das cascas, as mesmas foram mantidas em dessecador para evitar a umidificação do pó obtido o que poderia influenciar negativamente na realização das etapas posteriores, conforme representado na Figura 4.



Figura 4: Armazenamento do pó das cascas de banana.

Fonte: Elaborados pelos autores.

4.5 GRANULOMETRIA

Utilizou-se agitador de tamizes (Marconi) (Figura 5) com tamizes de dois tamanhos, com malhas de 0,50mm e 0,35mm durante 10 minutos. Obtendo-se de três tamanhos de partículas do pó da casca de banana, sendo elas menores que 0,35 mm, maiores que 0,35 mm e em C: maiores que 0,50 mm, as empregadas no estudo foram as menores que 0,35mm (Figura 6).



Figura 5: Agitador com tamizes.

Fonte: Elaborado pelos autores.



Figura 6: Diferenças granulométricas do pó da casca de banana após a tamisação. Em A: menores que 0,35 mm, em B: maiores que 0,35 mm e em C: maiores que 0,50 mm.

Fonte: Elaborado pelos autores.

4.6 MICRO-ORGANISMO

Para a realização da produção da proteína foi utilizado o fungo *Aspergillus niger* (IOC/CCFF 3998), doado pelo Instituto Oswaldo Cruz. A manutenção deste fungo (com repiques quinzenais) e crescimento para realização dos experimentos se deu em meio ágar Sabouraud a 28°C por 7 dias em estufa micológica (Fanem).

4.7 CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO

Para o ajuste da concentração do inóculo procedeu-se, em fluxo laminar (Veco) em zona asséptica, com auxílio de espátulas previamente esterilizadas, à raspagem das células fúngicas, para a ressuspensão em água previamente esterilizada e diluição. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer para a obtenção da concentração 10^7 esporos/mL, utilizada em todas as produções.

4.8 PRODUÇÃO DA PROTEÍNA FÚNGICA

A produção enzimática foi realizada por meio da fermentação líquida submersa (SmF) em erlenmeyers de 100 mL com volume final de 50 mL, em agitador orbital (Tecnal TE 420). O meio de cultura e as condições de cultivo utilizados foram descritos por El-Katatnyet al. (2000), com modificações, constituído de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2; K_2HPO_4 0,9 g ; KCl 0,2 g ; NH_4NO_3 1,0 g ; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,002 g ; $MnSO_4$ 0,002 g ; $ZnSO_4$ 0,002 g ; xilose 5,0 g ; lactose 5,0 g ; glicose 1,5 g ; sacarose 1,5 g e peptona de caseína 1,5 g dissolvidos em 1 L de água. O pH inicial do meio foi ajustado para 5,5, com ácido e/ou base fraca e a produção foi incubada durante 4 dias sob agitação constante de 150 rpm e temperatura de 30°C.

4.9 RECUPERAÇÃO DA PROTEÍNA

Após a produção o extrato proteico foi recuperado por meio de filtração a vácuo em papel de filtro de 2,0µm para separação da biomassa produzida. O filtrado foi armazenado a -20°C para as posteriores análises.

4.10 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE EXTINÇÃO MOLAR

As determinações da concentração de proteínas foram fundamentadas em soluções-padrão específicas. Para a determinação da concentração de proteínas foi empregada uma solução de albumina de soro bovino, em concentrações que variaram de 0,1 a 2mg/mL. As soluções-padrão passaram pelos mesmos procedimentos dos extratos brutos e a determinação do coeficiente de extinção molar foi baseada na lei de Lambert-Beer, onde o gráfico da curva da absorbância x concentração da amostra (µmols/mL) foi traçado, determinado-se o

coeficiente angular. O coeficiente de extinção molar (ϵ) foi determinado a partir da seguinte equação: $A = \epsilon \cdot b \cdot c$, em que A = Absorbância, ϵ = absorvidade, b = caminho óptico (1 cm) e c = concentração. Como $b = 1$, obtivemos: $\epsilon = A \div c$, em que ϵ é dado por $\mu\text{mol} \cdot \mu\text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, onde obteve-se resultado de 0,0007.

4.11 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Foram adicionados a tubos de ensaio 50 μL dos extratos brutos proteicos a serem dosadas e 1,5 mL do reagente de Bradford, adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich). Esta mistura foi mantida por 5 minutos em temperatura ambiente e procedeu-se a leitura a 595 nm em espectrofotômetro, zerando o aparelho com o branco da reação constituído de 1,5 mL do reagente de Bradford e 50 μL do extrato bruto proteico previamente desnaturado, durante 15 minutos em água fervente. As proteínas foram quantificadas empregando-se a curva analítica de soro albumina bovino como padrão (BRADFORD, 1976).

4.12 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO TAMPÃO

Preparou-se a solução tampão de acetato de sódio 50mM com pH 5,0 utilizada para realização das etapas de precipitação, conforme demonstrado na Figura 6. O ajuste do pH foi realizado com auxílio de um pHmetro (GEHAKA, Digital P6 1800) e com soluções de ácido e base fracas.

4.13 PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS

As produções de proteínas fúngicas foram realizadas em triplicatas (Figura 7). A precipitação foi realizada conforme a tabela de Dawson (1969), para cada porcentagem de precipitação pretendida a partir do volume de extrato bruto proteico obtido, sendo que a faixa de precipitação variou entre 20% e 30%.

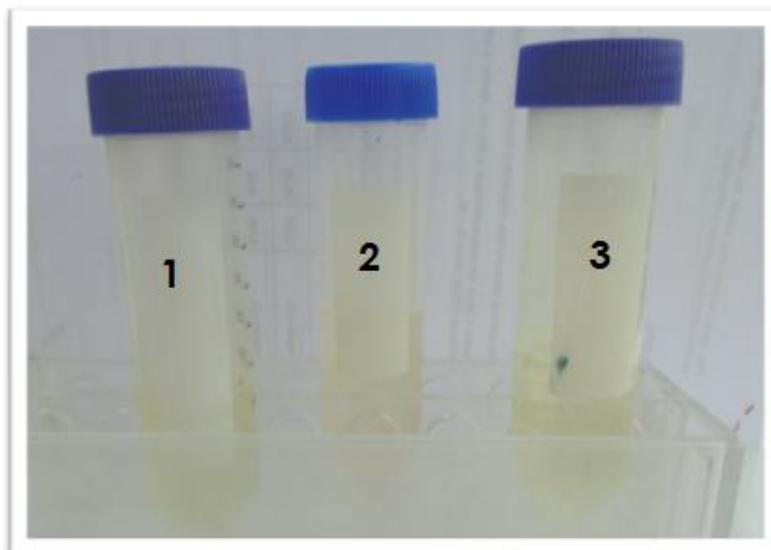


Figura 7: Amostras de proteínas 1, 2 e 3 a serem precipitadas
Fonte: Elaborada pelos autores

Estes extratos proteicos brutos foram transferidos para Béqueres, nos quais foi adicionado o pó da casca de banana para precipitar a proteína, sob agitação e refrigeração constantes, conforme demonstrado na Figura 8.



Figura 8: Precipitação sob agitação e temperatura constantes
Fonte: Elaborado pelos autores

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas para precipitar a casca da banana conjugada com a proteína. Após a centrifugação adicionou-se a solução tampão para ressuspender o precipitado novamente. Em seguida, dialisou-se as soluções em sacos de diálise de tamanho 3,500MWCO (Fisherbrand), conformedemonstradona Figura 8, contra solução tampão de acetato de sódio em pH 5,0em“overnight” , certificando-se da integridade do gelo para manter a baixa temperatura e da troca do tampão,que foi realizada uma vez (Figura 9).

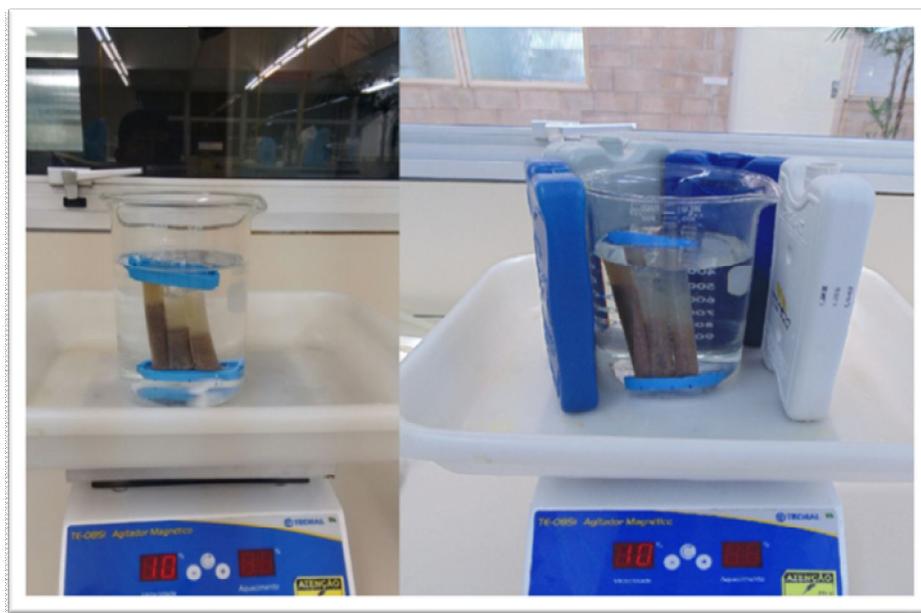


Figura 9: Tubos de diálise em solução tampão de acetato de sódio com pH 5,0
Fonte: Elaborado pelos autores

4.14 DOSAGEM DA PROTEÍNA APÓS A PRECIPITAÇÃO

Realizou-se a dosagem da proteína precipitada, do sobrenadante (A) de cada dialisado e também da mistura dos mesmos (A+B), porém não foi possível a dosagem em B (Figura 10) devido a influencia das partículas do pó, ou seja, após a mistura do sobrenadante com a casca de banana precipitada, com o intuito de se verificar a presença de proteínas em todas as soluções obtidas. Para dosagem de proteínas utilizou-se o método de Bradford, previamente descrito. E para verificar se as proteínas adsorvidas à casca de banana (em B) eram desorvidas, ressuspendeu-se a mistura em água, agitou-se vigorosamente e centrifugou-

se, dosou-se, em seguida, apenas o sobrenadante obtido. Estas etapas estão representadas a seguir.

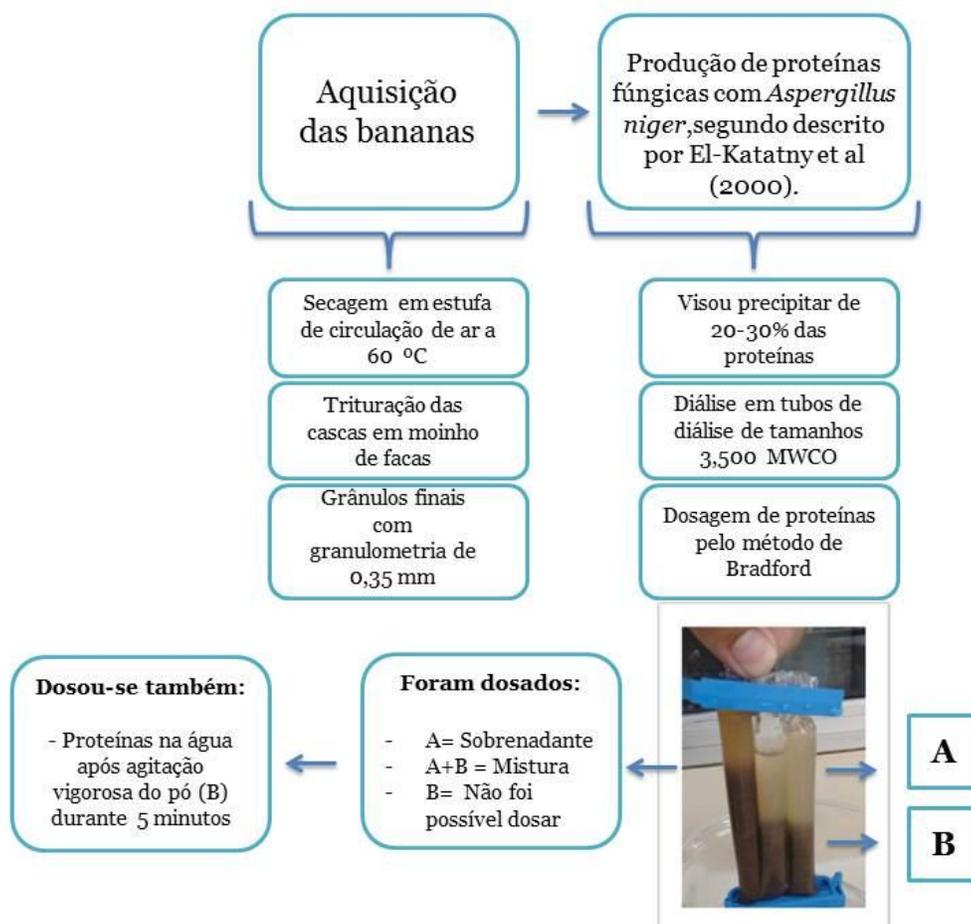


Figura 10: Fluxograma das etapas de obtenção do pó da casca de banana e precipitação de proteínas fúngicas.
Fonte: Elaborado pelos autores

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção enzimática realizada por meio de fermentação líquida submersa, utilizando *Aspergillus niger* em triplicata, apresentou os resultados demonstrados na Tabela 1, nota-se que houve maior produção de proteínas na primeira realização do teste.

Tabela 1: Concentração de proteínas obtidas por fermentação líquida submersa, utilizando *Aspergillus niger*

Produção	Concentração de proteínas (mg/mL)
1	0,020
2	0,010
3	0,007

Suhet e Fioreze (2011) avaliaram a produção de proteína por fermentação semissólida do resíduo da industrialização do abacaxi, com adição de uréia, com os fungos *Rhizopus oligosporus* e *Aspergillus niger*. Estes autores observaram que *A. niger* produziu 13,51% de proteína bruta.

Zen et al. (2014) utilizaram o *A. niger* para produção de lipídeos e proteínas a partir de resíduos agroindustriais e notaram maior produção de lipídeos nos meios em que continham glicose ou sulfato ferroso, enquanto os meios que mostraram melhor produção de proteínas continham 2,8 vezes a mais de glicose em relação aos que não continham o indutor.

Cruz et al. (2015) descreveram a produção de alfa-amilase por *A. niger* empregando resíduo de cascas de mandioca e os mesmos observaram que não houve influência significativa do tempo de fermentação, sendo a variação da atividade influenciada em maior parte pela umidade do resíduo, deste modo, observa-se que *A. niger* é um importante produtor de proteínas.

Após a submissão das proteínas à precipitação pelo pó oriundo da casca de banana, foi necessário realizar diálise com a finalidade de separar as proteínas do mesmo.

Assim, obtiveram-se três condições diferentes para cada produção precipitada, sendo sobrenadante (A), mistura do sobrenadante com o precipitado (A+B) e precipitado (B) ressuspenso em água destilada, conforme Figura 9.

Nota-se, como demonstrado na Tabela 2, que apenas o sobrenadante dialisado (A) da produção 1 apresentou pequena quantidade de proteínas, enquanto para as demais produções precipitadas as proteínas ficaram totalmente adsorvidas ao pó da casca de banana

Tabela 2: Concentração de proteínas observada no sobrenadante (A)

Produção	Concentração de proteínas (mg/mL)
1	0,002
2	0
3	0

Em contrapartida, ao dosar a proteína do sobrenadante misturado com o precipitado (A+B) pode-se notar que existiam proteínas em média na concentração de 0,037 mg/mL o que demonstrou que, aparentemente, as proteínas adsorvidas ao pó se desorviam em tampão, conforme representado na Figura 9.

Assim, com o intuito de verificar se haviam ainda mais proteínas adsorvidas ao pó ressuspendeu-se o precipitado (B) em água destilada e agitou-se vigorosamente para verificar se as proteínas desorviam-se do pó para quantificação. O resultado foi satisfatório, pois notou-se uma média de concentração de proteínas de 0,013 mg/mL, conforme representada na Figura 11.

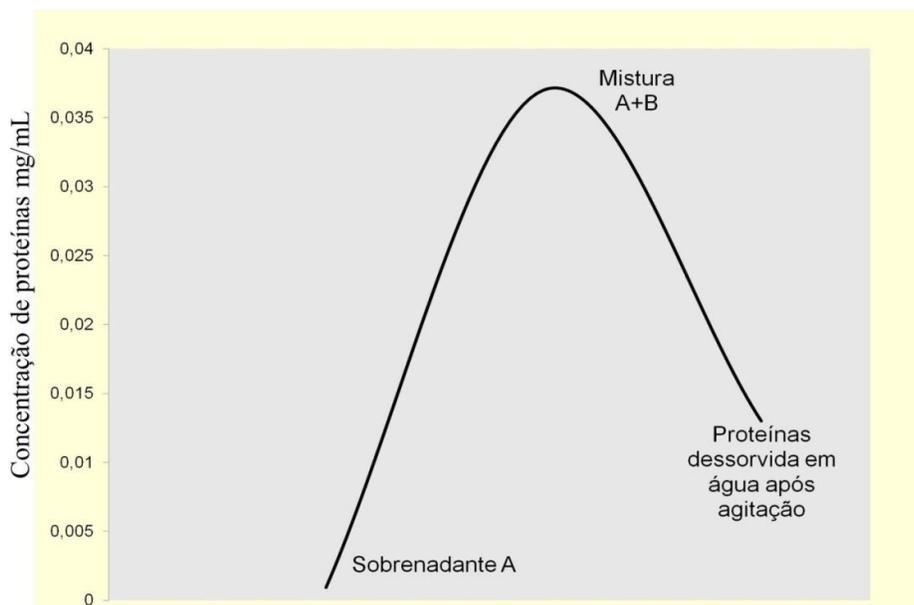


Figura 11: Concentração média de proteínas após a precipitação.
Fonte: Elaborado pelos autores

Segundo estes dados, observa-se que o pó da casca de banana apresenta capacidade de precipitar proteínas de interesse biotecnológico, porém nota-se que os procedimentos de agitação vigorosa do pó em água, bem como a diálise, não foram totalmente eficazes na dessorção das proteínas do pó, sendo necessários estudos mais aprofundados para se otimizar estes processos.

Sugere-se que a precipitação de proteínas com a casca de banana se dê pela interação de cargas, pois a casca de banana é carregada negativamente, enquanto algumas proteínas são carregadas positivamente, logo, ocorre a formação de compostos que podem ser dessorvidos, ou seja, separados posteriormente para reutilização (BONIOLO, 2008; COELHO et al., 2008).

Para realizar a dessorção da proteína da casca de banana utilizou-se a diálise, por ser um processo onde moléculas são separadas através de uma membrana semipermeável seletiva ao tamanho das partículas (peso molecular). Os tubos de diálise são semipermeáveis, fabricados em celulose regenerada ou éster de celulose, tendo uma consistência gelatinosa. Como a membrana seletivamente permite a passagem de solutos menores, mantendo espécies de maior porte, a diálise pode ser efetivamente usada como um processo de separação com base no tamanho molecular das partículas de interesse. A força motriz para separação de moléculas grandes (proteínas) de moléculas menores (pequenas proteínas, peptídeos,

aminoácidos e íons) é a diferença de concentração entre duas soluções em lados opostos da membrana. Entretanto, a permeabilidade do soluto é também dependente da forma molecular, carga, hidratação iônica e de polaridade da molécula (SAYEED et al., 2016).

Uma alternativa à diálise é a alteração de pH, que reduz a estabilidade de resíduos que ficam protonados e a ligação iônica é desfavorecida, ou seja, quebrada, promovendo a separação (GOMES et al., 2007).

Pode-se utilizar ainda, para dessorver proteínas, a cromatografia, que é um processo físico-químico de separação de misturas. Esse processo fundamenta-se no fato das substâncias presentes na mistura terem diferentes propriedades e composições, assim, a interação delas com as duas fases imiscíveis (fase estacionária e fase móvel) será diferente também, ou seja, a velocidade com que uma migra será maior que a outra, levando à separação (COLLINS et al., 2006).

Entretanto, neste estudo, para tentar dessorver as proteínas do pó utilizou-se água, visto que esta é um solvente universal, pois tem capacidade de atrair eletricamente átomos de hidrogênio e oxigênio, formando ligações covalentes muito fortes, apresentando conformação molecular mais eletricamente positiva em um dos lados e mais negativa no outro. Assim, as moléculas de água atraem outras moléculas e ainda umas às outras. Quando a água atrai outros átomos com carga elétrica, esses ficam juntos. Diante disso, acredita-se que a ligação das moléculas protéicas com a água tenha permitido afastar os compostos protéicos do pó da casca de banana. Porém, ressalta-se que são necessários estudos futuros mais aprofundados e que se comprovando esses dados, este método pode contribuir para a diminuição dos custos para a recuperação de proteína precipitadas e ainda com as questões ambientais (OLIVEIRA et al., 2005).

6 CONCLUSÃO

Concluiu-se que o pó proveniente da casca de banana nanica (*Musa cavendish*) foi capaz de precipitar proteínas fúngicas, porém são necessários estudos mais apurados para verificar quais as reais contribuições que estes dados podem trazer para a redução de custos na obtenção de produtos biotecnológicos em alto grau de pureza e ainda para a redução do acúmulo de resíduos ambientais.

REFERÊNCIAS

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). ABNT NBR 10004:2004 Resíduos sólidos - Classificação. Rio de Janeiro, 2004.

ABBAS, F. S. Thorium removal from waste water using Banana peel and employment of Waste Residue. **Advances in Natural and Applied Sciences**, v. 7, n. 3, p. 336-345, 2013.

ADB, Asian Development Bank. (2001). Agricultural Biotechnology, Poverty Reduction and Food Security. Manila, Philippines.

ALVES, JOSE ÉLIO et al. **Banana para importação: Aspectos técnicos da produção**. Brasília: Embrapa-spi, 1995.

ARAÚJO, L. R.; ANDREOLO, Jesuíno; SILVA, Maria Sebastiana. Utilização de suplemento alimentar e anabolizante por praticantes de musculação nas academias de Goiânia-GO. **Rev. Bras. Ciên. e Mov. Brasília** v. 10, n. 3, 2002.

BARREDO, J. L. Microbial enzymes and biotransformations. Human Press Totowa. In: SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K.M; PANDEY, A. L- **Glutaminase as a therapeutic enzyme of microbial origin**, New Jersey. 2005.

BELISÁRIO, Marciela et al. O emprego de resíduos naturais no tratamento de efluentes contaminados com fármacos poluentes. **InterSciencePlace**, v. 1, n. 10, 2015.

BIANCHI, CARLOS. Grupos de pesquisa em biotecnologia moderna no Brasil: uma revisão sobre os fundamentos da política de CTI, **Rev. iberoam. cienc. tecnol. soc.** v.7, n.21, Buenos Aires, 2013.

BÓRÉM, A. A história da biotecnologia – ciência que está surpreendendo até os mais otimistas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. N. 34, p. 10-12. janeiro-junho 2005.

BONIOLO, M. **Biossorção de urânio nas cascas de banana**. Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais.2008

COIMBRA, Michelle Cardoso. Produção de etanol utilizando cascas de banana e de laranja por co-fermentação de *Zymomonas mobilis* e *Pichia stipitis*. 2015.

COELHO, MARIA ALICE ZARUR; SALGADO, ANDREA MEDEIROS; RIBEIRO, BERNARDO DIAS. **Tecnologia enzimática**. Editora EPUB, p. 08-12. 2008.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA. **Enzimas: Ferramentas indispensáveis num mundo vivo**. Disponível em: <http://www.cib.org.br/pdf/fbci12port.pdf>. Acesso em 02fev 2016.

COLLINS, C. H; BRAGA, G. L; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Unicamp, Campinas, 453p, 2006.

CAVALCANTE, LIRA SILVA NARLISE. Bioquímica dos aminoácidos. **União de Ensino Superior de Campina Grande**. Março de 2015.

DOELLE, Horst W..Biotechnology and Human Development in Developing Countries.**Electron. J. Biotechnology**, Valparaíso , v. 4, n. 3, p. 17-18, dic. 2001.

DAWSON, R.M.C.; ELLIOT, D.C.; ELLIOT, W.H.; JONES, K.M. **Biochemical Research**, New York: Oxford University Press, 2 ed, 1969.

DA CRUZ, Ellen Abreu et al. Produção de Alfa-Amilase por *Aspergillus niger* em Resíduo de Cascas de Mandioca. **Journal of Health Sciences**, v. 13, n. 4, 2015.

FAEP.Federação de agricultura do estado do Paraná. Cartilha de classificação de frutas.Disponívelem: <<http://www.faep.com.br/comissoes/frutas/cartilhas/frutas/banana.htm>>. Acesso 01 nov. 2016.

FENGXIA, L.; MEI, L.; ZHAOXIN, L.; XIAOMEI, B.; HAIZHEN, Z.; YI, W. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5938–5941. 2008.

GOMES, E; GUEZ, M. A. U; MARTIN, N; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: Fontes, Produção e Aplicação Industrial. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 1, 136-145, 2007.

GOLUNSKI, SIMONI MARIA. **Estratégias de purificação de Iluniase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y – 7571**, Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da URI, Erechim, RS, 2014.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995.

LICHTIG, I.; MONTEIRO, S. R. G.; COUTO, M. I. V.; HARO, F. M. B.; CAMPOS, M. S. C.; VAZ, F. A. C.; OKAY, Y. Avaliação do comportamento auditivo e neuropsicomotor em lactentes de baixo peso ao nascimento. **R. Med. Br.**, v. 47, n. 1, 2001.

MONTEIRO, VALDIRENE N.; SILVA, ROBERTO DO NASCIMENTO. **Aplicações industriais da biotecnologia enzimática**. Processos químicos SENAI, v.5, p. 9-23. 2009

MONTIBELLER, MM. Remoção de fenol de águas residuárias utilizando método de polimerização e precipitação com enzima Horseradishperoxidase, Florianópolis, 2012.

OLIVEIRA, S. IVAN; JEUS, B. L. VITOR. **Introdução à física do estado sólido**. Livraria da Física, São Paulo, p. 361, 2005.

ORANDELLI, RAVELY CASAROTTI et al. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. **Revista Saúde e Biologia**.v.7, n.3, p97-109, 2012.

RIBEIRO, Bernardo D. et al. Aplicação de Enzimas: Propostas para Disciplina Experimental. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 5, p. 787-805, 2013.

ROBYT, J.F.; WHITE, B.J. **Biochemical techniques: theory and practice**. Estados Unidos: Waveland Press, 2000.

ROSSO, SIBELE RECCO. **Aproveitamento do resíduo da agroindústria da banana: caracterização química e levantamento de parâmetros termodinâmicos**. Dissertação de pós-graduação apresentado a Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.

SAYEED, Khaleel et al. **Anaphylactic Shock at the Beginning of Hemodialysis**. In: *Seminars in dialysis*. 2016.

SENA, JOSÉ VLADIMIR CARDOSO. Aspectos da produção e mercado da banana no nordeste. Banco do nordeste, **Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste – ETENE**, ano V, Julho 2011, v. 10.

SILVA, C.O; MOURA, C.L; MELLO, G.N. Caracterização de adsorvente natural para retenção de cromo no solo. **Brazilian Educational Technoly: research and learning**, v.2, n.3, p.105-144, 2011.

SOUZA, O; FEDERIZZI, M; COELHO, B; WAGNER, T.B; WISBECK, E. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos gerados na bananicultura e sua valorização para a produção de biogás. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.4, p. 438-443, 2010.

SOUSA, Dennis Dantas de et al. **Produção e avaliação da farinha da casca de banana como bioadsorvente na remoção de corantes têxteis em águas residuárias**. 2015.

SUHETI, M. I.; FIOREZE, R. Produção de proteína unicelular a partir do resíduo da industrialização do abacaxi utilizando fermentação em estado semissólido. *Rev. Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 05, n. 02, 2011.

SPIER, RIGON MICHELE. **Produção de Enzimas Amilolíticas Fúngicas α -amilase e Amiloglicosidase por Fermentação no Estado Sólido**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia. UFPR, Curitiba, 2005.

TREICHEL, H. et al. A Review on Microbial Lipases Production. **Food Bioprocess Technology**. v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.

VOET, Donald; VOET, Judith G.; PRATT, Charlotte W. **Fundamentos de Bioquímica: A Vida em Nível Molecular**. Artmed Editora, 2014.

ZEN, C. K.; SILVA, K. P.; BERTOLIN, T. E.; REINEHR, C. O.; COLLA, L. M. Indução da síntese de lipídios e proteínas por *Aspergillus niger*. *Revista CIATEC – UPF*, vol.6, 2014.

ZAIA, DIMAS. A. M.; ZAIA, CASSIA THAIS B. V.; LICHTIG, JAIM. **Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes**. *Química Nova* 1998 v. 26, p. 787-793;

ZIMMER, KARINE RIGON et al. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p.123-137, 2009.

WANDERLEY, MARCEL DUARTE; NEVES, ETNEY; ANDRADE, CRISTIANO JOSÉ DE. Aspectos da produção industrial de enzimas, **revista CITINO**, Vol.1, No.1, 2011.