

Utilização de resíduos têxteis funcionalizados na imobilização de lipases

Use of functionalized textile wastes in lipases immobilization

Daniele Cardoso da Silva
danicardoso.07@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Luana Dumas Coutinho
luanadumas@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Alessandra Machado Baron
alessandrab@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Patrícia Salomão Garcia
patriciagarcia@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Milena Martins Andrade
milenaandrade@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

RESUMO

Toneladas de resíduos sólidos têxteis são gerados a cada ano. Uma parte é reaproveitada na cadeia têxtil, mas outra parte é descartada de forma irregular, ocasionando impactos ambientais. Uma possibilidade de reuso destes resíduos é a utilização como suporte na imobilização de enzimas, como lipases. Estas enzimas catalisam uma série de reações e devido a isso são amplamente utilizadas industrialmente. Este trabalho teve como objetivo utilizar os resíduos sólidos têxteis gerados pelos laboratórios da UTFPR de Apucarana na imobilização da lipase *Botryosphaeria ribis* EC-01. Estes resíduos foram funcionalizados com glutaraldeído para promover maior número de interações enzima/suporte. A enzima foi produzida em condição otimizada que utiliza torta de soja e glicerol e concentrada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 20% (m/v). As concentrações avaliadas do agente bifuncional, o glutaraldeído foram de 1, 2 e 3% (v/v). Dentre os dois resíduos testados, a maior atividade enzimática foi obtida com a imobilização da enzima em tecido não beneficiado (TNB) com 1% (v/v) de glutaraldeído no tempo de 5 horas ($40,3 \pm 0,35 \text{ U/g}_{\text{suporte}}$). A vantagem do glutaraldeído é a obtenção de uma ligação cruzada (*cross-linking*) estável entre enzima/suporte. Este trabalho apresentou evidências de que resíduos têxteis são alternativas viáveis para produzir um biocatalisador reutilizável, diminuindo os custos de sua aplicação.

PALAVRAS-CHAVE: Resíduos têxteis. *Cross-linking*. Biocatalisador.

ABSTRACT

Every year tons of solid textile wastes are generated. Only one part is reused in the textile chain, but another part is irregularly disposed, causing environmental impacts. A possibility of reuse of these residues is to use them as support in the immobilization of enzymes, such as lipases. These enzymes catalyze a number of reactions and because of this are widely used industrially. This work aimed to use solid textile waste from UTFPR Apucarana laboratories in the immobilization of *Botryosphaeria ribis* EC-01 lipase. These residues were functionalized with glutaraldehyde to promote greater number of enzyme / support interactions. The enzyme was produced under optimized conditions using soybean meal and glycerol and concentrated with 20% (m/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Glutaraldehyde concentrations evaluated were 1, 2 and 3% (v/v). Among the two residues tested, highest enzymatic activity was obtained with enzyme immobilization in non-benefited fabric (TNB) with glutaraldehyde 1% (v/v) with 5 hours of contact ($40.3 \pm 0.35 \text{ U/g}_{\text{support}}$). The advantage of glutaraldehyde is to obtain a stable cross-linking between enzyme and support. This work presented evidence that textile residues are viable alternatives to produce a reusable biocatalyst, reducing the costs of its application.

KEYWORDS: Textile residues. *Cross-linking*. Biocatalyst.

Recebido: 31 ago. 2018.

Aprovado: 04 out. 2018.

Direito autoral:

Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

No Brasil, o setor têxtil, abrange mais de 30 mil empresas que utiliza fios, tecelagens, confecções e fibras para fabricação de seus produtos. Cerca de 10% de tecido é desperdiçado no setor de corte, que na maioria das vezes é incorporado ao custo do produto. Este material descartado muitas vezes não é reaproveitado e gera cerca de 175 mil toneladas/ano de resíduos, comprometendo os recursos naturais (ULIANO et al., 2013; ALENCAR et al., 2015) e necessita uma destinação adequada.

Uma forma de reaproveitamento desses resíduos é utilizá-lo na imobilização de enzimas. Uma das enzimas mais utilizadas industrialmente são as lipases que na indústria têxtil são utilizados para remover lubrificantes do tecido e melhorar o processo de tingimento e também em processos de biopolimento de jeans e outros tecidos de algodão (SHARMA et al., 2001; HASAN et al., 2006).

As lipases (EC 3.1.1.3; triacilglicerolacilhidrolases) catalisam reações de hidrólise, esterificação, interesterificação, transesterificação, aminólises, entre outras (JAEGER; EGGERT, 2002; SHARMA et al., 2011). Estas enzimas são produzidas por plantas, animais e micro-organismos (SHARMA et al., 2001). Dentre os micro-organismos produtores de lipases, as lipases fúngicas são preferíveis por serem extracelulares, o que reduz o custo de extração da enzima e ainda, exibem maior estabilidade e especificidade pelo substrato em diversas condições físico-químicas (MEHTA et al., 2017).

O fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 foi descrito como bom produtor de lipases em óleos vegetais (MESSIAS et al., 2009) e em tortas vegetais, como a torta de soja (ANDRADE et al., 2013). O uso de torta de soja contribui para diminuir os custos de produção desta enzima, já que na região norte do Paraná existe diversas indústrias extratoras de óleo de soja, portanto disponibilidade da torta vegetal. A produção de lipases por *B. ribis* EC-01 foi otimizada por planejamentos fatoriais, utilizando torta de soja e glicerol como substrato e os custos baseado nos nutrientes foi de US\$ 0,42 o litro de meio (ANDRADE et al., 2013).

Estas enzimas geralmente são utilizadas na forma imobilizada que permite a sua recuperação e reutilização. Diversas técnicas podem ser empregadas na imobilização de enzimas, dentre elas podemos destacar a ligação cruzada (*cross-linking*) da enzima com o suporte, utilizando agentes funcionais como o glutaraldeído (VILLENEUVE et al., 2000).

Portanto, este trabalho teve como objetivo desenvolver um biocatalisador de baixo custo pelo reaproveitamento de resíduos têxteis funcionalizados com glutaraldeído para imobilizar lipases, produzidas por *Botryosphaeria ribis* EC-01 em torta de soja em condições de fermentação submersa.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

A torta de soja foi doada pela IMCOPA Importação, Exportação e Indústria de Óleos S.A (Cambé-PR). O padrão palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP) foi adquirido de Sigma-Aldrich (EUA). O glutaraldeído 50% foi adquirido de FlukaAnalytical

(EUA). Os resíduos têxteis foram provenientes dos Laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento e de Produção do Vestuário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Apucarana. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

PRODUÇÃO DO INÓCULO E OBTENÇÃO DAS ENZIMAS LIPASES

Botryosphaeria ribis EC-01 (GenBankAccessionNumber DQ852308) foi mantido em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) inclinado a 4°C e repicado trimestralmente. *B. ribis* EC-01 foi transferido do meio de manutenção para placas de Petri com VGA (Vogel (1956), glucose 1% (m/v) e ágar) e incubadas à 28 ± 2°C por 5 dias. Após este período, esferas (0,7 cm de diâmetro) com hifas do fungo foram cortadas e inoculadas em frascos de *Erlenmeyer* (125 mL) com 25 mL de meio otimizado por Andrade et al. (2013) composto por 2,37% (m/v) de torta de soja e 4,5% (v/v) de glicerol PA. Os cultivos permaneceram em agitação (180 rpm) por 5 dias à 28°C, e interrompidos por centrifugação (5000 rpm/15 min). Os extratos brutos livres de células foram parcialmente purificados por precipitação com (NH₄)₂SO₄ (20%, m/v), dialisados e armazenados à 4°C.

FUNCIONALIZAÇÃO DOS RESÍDUOS TÊXTEIS COM GLUTARALDEÍDO

Dois tipos de resíduos têxteis foram utilizados. Um resíduo têxtil proveniente de algodão cru sem tratamento (não beneficiado – TNB) e outro proveniente de algodão beneficiado (TB). Em frascos *Erlenmeyer* de 125 mL, 30 amostras (1x1 cm) de cada resíduo têxtil foram adicionadas, separadamente. A ativação desses resíduos com glutaraldeído (GA) foi realizado deixando-se em contato com 50 mL de glutaraldeído a 1, 2 e 3% (v/v), durante 24h em agitador orbital a 25°C e 150 rpm. Após esse tempo, o suporte foi lavado com água deionizada, liofilizados e armazenado para posterior imobilização.

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM RESÍDUO TÊXTIL FUNCIONALIZADO

A imobilização foi realizada deixando-se em contato 7 amostras de tecido funcionalizados com GA (aproximadamente 0,160 g de TNB e 0,288 g de TB) com 5 mL de solução enzimática em tampão fosfato pH (11,8 U/mL) em frascos *Erlenmeyer* de 50 mL. Os frascos permaneceram em agitador orbital a 150 rpm, 25°C e em intervalos de tempo estipulados (1h, 2h e 5h) os frascos foram retirados e seu conteúdo filtrado a vácuo. O imobilizado foi lavado duas vezes com tampão fosfato pH 8,0 (0,2 M), e água destilada e liofilizados. A atividade enzimática foi determinada no derivado e no sobrenadante.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE LIPASE E DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

As atividades da lipase livre e imobilizada foram determinadas espectrofotometricamente, utilizando-se p-NPP como substrato, em pH 8,0, 55 °C, 2 min e 410 nm (MESSIAS et al., 2009). A unidade de lipase foi definida como a liberação de 1µmol de p-NPP por min, por mL da solução de enzima. A concentração de proteínas extracelulares foi determinada pelo método de

Bradford (1976). A albumina de soro bovino foi utilizada como padrão para construção de uma curva analítica (0 – 250 mg/mL).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As lipases microbianas, as mais utilizadas industrialmente, são obtidas principalmente por fermentação submersa (FSub) em um meio muitas vezes complexo dependente de fatores como temperatura, agitação, fontes de carbono, nitrogênio, fosfato, lipídeo, entre outros (SHARMA et al., 2001).

O meio utilizado é o principal fator que encarece o preço da enzima. A produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 foi otimizada por Andrade et al. (2013), com 2,37% (m/v) de torta de soja e 4,5% (v/v) de glicerol, fazendo com que a produção desta enzima seja US \$ 0,42 por litro de meio. A torta de soja é rica em proteínas (47,5%) constituindo um substrato viável para crescimento de micro-organismo e produção de enzimas (RAMACHANDRAN et al., 2007). A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos na produção desta enzima em condição otimizada previamente antes e após o tratamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e após a diálise contra água deionizada.

Tabela 1 – Produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* EC-01 e precipitação com sulfato de amônio

Amostra	U/mL	U/mg
Extrato bruto	47,6 ± 1,63	154 ± 5,29
Lipase após concentração (20%, m/v $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	85,0 ± 4,66	231 ± 12,7
Lipase após concentração e diálise	133 ± 0,05	383 ± 4,31

Fonte: Autoria própria (2018).

O valor de 47,6 U/mL alcançado com a produção de lipases em condição otimizada foi considerado satisfatório, já que o valor predito apontado pelo modelo para esta condição é de 72 U/mL (ANDRADE et al., 2013). São diversas as variáveis que afetam a produção de enzimas como as lipases. A agitação é um dos fatores que exerce forte influência (SOOCH; KAULDHAR, 2013). Mesmo a agitação ser fixa (180 rpm), a otimização da produção foi avaliada em equipamento diferente ao utilizado neste trabalho, sendo esta, uma possível explicação para a produção desta enzima ser diferente a obtida anteriormente. Após o tratamento com 20% (m/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a atividade enzimática quase dobrou (85,0 U/mL), indicando que a enzima de interesse foi precipitada e passando para 133 U/mL após a retirada do sal com o processo de diálise. A atividade específica aumentou 2,5 vezes ao final do processo (383 U/mg), demonstrando que o processo de concentração desta enzima foi eficiente.

Uma solução desta enzima foi preparada e utilizada para imobilização em resíduos têxteis funcionalizados com glutaraldeído. Os resultados estão na Tabela 2. A maior atividade enzimática foi obtida com a imobilização da enzima em TNB funcionalizado com 1% (v/v) de glutaraldeído no tempo de 5 horas ($40,3 \pm 0,35$ U/g_{TNB}). O aumento da concentração do agente bifuncional (acima de 1%, v/v) influenciou negativamente, reduzindo a quantidade de enzima imobilizada. Com o aumento do tempo houve também aumento na atividade da enzima imobilizada, na maioria dos experimentos. O tempo de contato e a concentração do agente de funcionalização são alguns dos fatores que determinam a eficiência do processo. O aumento do tempo ou o uso de altas concentrações podem gerar

extensas reticulações (MENDES et al., 2011). Altas concentrações de glutaraldeído podem induzir distorções na estrutura da enzima, afetando sua atividade biológica (MIGNEAULT et al., 2004).

Tabela 2 – Imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em resíduo têxtil funcionalizado

Resíduo têxtil	Concentração de glutaraldeído	Atividade de lipase (U/g suporte)		
		1h	2h	5h
TNB	1%	24,9 ± 2,14	21,3 ± 1,21	40,3 ± 0,35
	2%	12,8 ± 0,18	13,8 ± 0,10	13,8 ± 1,52
	3%	7,95 ± 0,87	10,6 ± 0,52	14,2 ± 0,91
TB	1%	2,67 ± 0,33	16,7 ± 1,13	7,54 ± 1,09
	2%	2,45 ± 0,61	5,35 ± 0,51	6,27 ± 0,29
	3%	3,10 ± 0,25	4,34 ± 0,24	4,58 ± 0,09

Fonte: autoria própria (2018).

O resíduo têxtil TNB é conhecido como algodão cru que ainda não passou pelo processo de desengomagem que tem por finalidade a retirada da “goma” aplicada aos fios para facilitar o processo de tecimento (SENAI, 2018). Esta goma que geralmente é de amido interfere na hidrofiliabilidade do tecido, característica importante para receber o corante. O amido presente na superfície do resíduo TNB parece ter favorecido a imobilização por ligação cruzada, já que possui vários grupos hidroxila (OH), assim como a superfície do tecido, composta por celulose, um polímero de glicose. Esses grupamentos OH livres, tanto do tecido como do amido, favorecem a ligação cruzada entre o glutaraldeído e o suporte, já que o glutaraldeído tem a capacidade de reagir com diversos grupamentos, incluindo o grupamento hidroxila (MIGNEAULT et al., 2004). Desta forma, o resíduo TB apresentou os menores valores de atividade de enzima imobilizada, já que os grupamentos hidroxila presentes estão em menor quantidade, promovendo menor número de ligações cruzadas. Possivelmente neste caso a imobilização se deu também por adsorção, mas a superfície hidrofílica do suporte desfavoreceu a imobilização, que é realizada com solução aquosa da enzima.

Existem poucos relatos na literatura que utilizam tecido de algodão funcionalizados com glutaraldeído para imobilizar enzimas. Uma β -galactosidase foi imobilizada em tecido de algodão utilizando glutaraldeído como agente de *cross-linking*. A enzima imobilizada foi utilizada para hidrolisar lactose de leite integral e cerca de 95% de hidrólise foi obtido após 2 horas (LI; ZHOU; CHEN, 2006). Desta forma, o suporte em estudo pode ser futuramente aplicado como biocatalisador, consistindo em uma forma viável economicamente, reduzindo os custos da biocatálise devido a possibilidade de reuso.

CONCLUSÕES

A lipase de *B. ribis* EC-01 foi produzida e concentrada de forma eficiente evidenciado pela alta atividade específica ao final do processo. A imobilização desta enzima em resíduos têxteis alcançou máximo de atividade utilizando o tecido não beneficiado funcionalizado com 1% (v/v) de glutaraldeído com 5 horas de contato. Este biocatalisador é promissor para futuras aplicações, e ainda, agrega valor a estes resíduos.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, J. L. S.; SIMONI, J. H.; FIORELLI, M. N.; LINK, P. P.; DE ANGELIS NETO, G. Os efeitos socioambientais causados pelos resíduos sólidos das indústrias de confecções do polo moda de Maringá – PR. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, p. 478-504, 2015. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/reget/article/viewFile/18381/pdf>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

ANDRADE, M. M.; BARBOSA, A. M.; BOFINGER, M. R.; DEKKER, R. F. H.; MESSIAS, J. M.; GUEDES, C. L. B.; ZAMINELLI, T.; OLIVEIRA, B. H.; LIMA, V. M. G.; DALL'ANTONIA, L. H. Lipase Production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on Soybean and Castorbean Meals: Optimization, Immobilization, and Application for Biodiesel Production. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 170, p. 1792-1806, 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/76115>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 54-248, 1976. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Quim. Nova**, v. 38, p. 399-409, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422015000300399&script=sci_abstract&tlng=es>. Acesso em: 05 abr. 2018.

CAZABAN, D.; WILSON, L.; BETANCOR, L. Lipase immobilization on siliceous supports: application to synthetic reactions. **Curr. Org. Chem.**, v. 21, p. 85-92, 2017. Disponível em: <<https://www.eurekaselect.com/147163/article>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Quim. Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422004000400017&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 05 abr. 2018.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microb. Technol.**, v. 39, p. 235-251, 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022905004606>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

JAEGER, K-E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 13, p. 390-397, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12323363>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase-A Critical Review. **Crit. Ver. Biotechnol.**, v. 28, p. 253-264, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19051104>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

KIM, H. J.; PARK, S.; KIM, S. H.; KIM, J. H.; YU, H.; KIM, H. J.; YANG, Y-H.; KAN, E.; LEE, S. H. Biocompatible cellulose nanocrystals as supports to immobilize lipase. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 122, p. 170-178, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117715300680>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

LI, X.; ZHOU, Q. Z. K.; CHEN, X. D. Pilot-scale lactose hydrolysis using β -galactosidase immobilized on cotton fabric. **Chel. Eng. Process.**, v. 46, p. 497-500, 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0255270106002169>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

MEHTA, A.; BODH, U.; GUPTA, R. Fungal lipases: a review. **J. Biotech Res.**, v. 8, p. 58-77, 2017. Disponível em: <<http://www.btsjournals.com/assets/2017v8p58-77.pdf>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Quim. Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422011000500019>. Acesso em: 05 abr. 2018.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; DEKKER, R. F. F.; REZENDE, M. I.; KRIEGER, N. N.; BARBOSA, A. M. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 45, p. 426-431, 2009. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/6492?locale-attribute=en>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M. J.; WALDRON, K. C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme cross-linking. **BioTechniques**, v. 37, p. 790-802, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15560135>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

PASHANGEH, K. AKHOND, M.; KARBALAEI-HEIDARI, H. R.; ABSALAN, G. Biochemical characterization and stability assessment of *Rhizopusoryzae* lipase covalently immobilized on amino-functionalized magnetic nanoparticles. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 105, p. 300-307, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28711611>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

RAMACHANDRAN, S.; SINGH, S. K.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Oil cakes and their biotechnological applications – a review. **Bioresour. Technol.** v. 98, p.



2000-2009, 2007. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17023161>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

RUEDA, N.; dos SANTOS, J. C. S.; ORTIZ, C.; BARBOSA, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; TORRES, R. Chemical amination of lipases improves their immobilization on octyl-glyoxyl, agarose bead. **Catal. Today**. V. 259, p. 107-118, 2015. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920586115003454>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

SENAI. **Beneficiamento têxtil**. São Paulo: Editora SESI SENAI, 2018.

SHARMA, D.; SHARMA, B.; SHUKLA, A.K. Biotechnological approach of microbial lipase: a review. **Biotechn**. V. 10, p. 23-40, 2011. Disponível em:
<<https://scialert.net/abstract/?doi=biotech.2011.23.40>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C.; Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechn. Adv.**, v. 19, p. 627-662, 2001. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14550014>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

SOOCH, B. S.; KAULDHAR, B. S. Influence of Multiple Bioprocess Parameters on Production of Lipase from *Pseudomonas* sp. BWS-5. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 56, n. 5, p. 711-721, 2013. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132013000500002>. Acesso em: 05 abr. 2018.

ULIANO, J. C.; MATTGE, K.; ALMEIDA, A. A. Reuso de resíduos sólidos têxteis para oficinas de confecções. Iniciação científica CESUMAR, v. 15, p. 85-95, 2013. Disponível em:
<<http://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/iccesumar/article/view/2842>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 9, p. 113-148, 2000. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117799001071>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

VOGEL, H. J. A conveniente growthmedium for Neurospora (Medium N). **Microb. Genet. Bull.**, v. 13, p.42-43, 1956. Disponível em:
<[http://www.scirp.org/\(S\(i43dyn45teexjx455q3d2q\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1379446](http://www.scirp.org/(S(i43dyn45teexjx455q3d2q))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1379446)>. Acesso em: 22 ago. 2018.