



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE ENZIMAS DE FORMA  
COMBINADA NA BIOPREPARAÇÃO DE TECIDOS FELPUDOS  
DE ALGODÃO**

**FRANCIELE REGINA FURLAN**

**FLORIANÓPOLIS**

**2012**



**Franciele Regina Furlan**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPÓSITOS DE  
POLIPROPILENO/BENTONITA ORGANOFÍLICA DE  
MOÇAMBIQUE**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza

Coorientadora: Prof<sup>sa</sup> Dr<sup>a</sup> Selene M. A. Guelli Ulson de Souza

Coorientadora: Prof<sup>sa</sup> Dr<sup>a</sup> Elaine V. Takeshita

Florianópolis

2012



# CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE ENZIMAS DE FORMA COMBINADA NA BIOPREPARAÇÃO DE TECIDOS FELPUDOS DE ALGODÃO

FRANCIELE REGINA FURLAN

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

---

Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza  
Orientador, EQA, UFSC

---

Prof<sup>sa</sup> Dr<sup>a</sup> Selene M. A. G. Ulson de Souza  
Coorientadora

---

Prof<sup>sa</sup> Dr<sup>a</sup> Elaine V. Takeshita  
Coorientadora

---

Prof. Dr. Ricardo Antonio Francisco Machado  
Coordenador do POSENQ

## **Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza

---

Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior

---

Prof. Dr. Ayres Ferreira Morgado

---

Prof<sup>sa</sup> Dr<sup>a</sup> Débora de Oliveira

---

Prof<sup>sa</sup> Dr<sup>a</sup> Rita de Cassia Siqueira Curto Valle

---

Prof. Dr. Everton Skoronski

Florianópolis,



## RESUMO

No presente trabalho investigou-se a viabilidade da utilização do *pool enzimático* celulase (E.C. 3.2.1.4), pectinase (E.C. 4.2.2.2) e amilase (E.C. 3.2.1.1), na biopreparação de tecidos felpudos 100% algodão. Foram determinadas as atividades enzimáticas em diferentes condições de processo, variando-se os parâmetros pH, temperatura e tempo de reação, investigando-se ainda a melhor combinação entre as enzimas, com a finalidade de remover constituintes celulósicos e não celulósicos presentes nas fibras de algodão (pectinas e amido). Avaliou-se dois processos de biopreparação, primeiramente com a adição de agentes umectante e sequestrante no início do processo e outro após a reação enzimática. Foi avaliado também o desempenho de uma celulase neutra e dos corantes reativos amarelo 145, vermelho 194 e azul 221 na etapa de tingimento, verificando a eficácia do tingimento e biopolimento simultâneos, através das análises de cor no sistema CIELab e testes de *pillling* e formação de pó (pilosidade). Para fins comparativos, realizou-se uma preparação alcalina convencional com as condições normalmente utilizadas nas indústrias. A comparação das propriedades dos tecidos, tais como perda de massa, hidrofiliidade, grau de alvura, percentual de pectina removida e percentual de residual de amido confirmou que a biopreparação pode ser tão eficaz quanto o processo alcalino convencional. Os resultados mostram que a presença do umectante não interfere na atividade enzimática e melhora a hidrofiliidade do tecido. A presença do sequestrante diminui a atividade, promovendo uma redução de 9% na atividade da enzima amilase e 11% na atividade das enzimas pectinase e celulase. Os melhores resultados dos ensaios, em geral, ocorreram ao se utilizar o agente sequestrante após 30 minutos de reação enzimática, temperatura de 65°C, pH 6,5 e combinação de 66% pectinase, 17% amilase e 17% celulase, resultando em uma diminuição de 81% de pectina no tecido, hidrofiliidade instantânea, grau de alvura em torno de 21°Berger e residual de amido entre 0,10 e 0,14%. Na avaliação da interferência de uma celulase neutra no rendimento dos corantes não foi verificada influência negativa da celulase sobre a montagem dos corantes na fibra celulósica e nem o processo de biopolimento foi afetado quando realizado na presença de corantes reativos. Através dos ensaios realizados em máquina piloto de produção, verificou-se que, utilizando o processo proposto, os resultados dos testes de solidez, *pillling* e pilosidade atenderam os padrões de qualidade exigidos pela indústria têxtil, e sua viabilidade econômica foi comprovada através de análises de custos.

**Palavras-chave:** biopreparação, preparação alcalina, pectinase, amilase, celulase, algodão.

## ABSTRACT

The potential for using an enzymatic pool consisting of cellulase (EC 3.2.1.4), pectinase (EC 4.2.2.2) and amylase (EC 3.2.1.1) for the biopreparation of 100% cotton plush fabrics was investigated. The enzymatic activity was determined under different process parameters (pH, temperature and reaction time). A good composition of the three enzymes was found for the best capability for removal non-cellulosic components from cotton fibers (pectins and starch). The influence of sequestering and wetting agents addition over the biopreparation process have been evaluated under two conditions: first by adding the agents early in the process and another after the enzymatic reaction. The performance in the dyeing step has been evaluated for the simultaneous application of a neutral cellulase and reactive dyes (yellow 145, yellow 194 and blue 221), verifying the effectiveness of dyeing through color analysis in the CIELab system, pilling and formation powder testing (hairiness). The results for cotton fabric submitted for biopreparation have been compared with a conventional alkaline process, under conditions normally used in the textile industry. A comparison of the fabrics properties, such as weight loss, hydrophilicity, degree of whiteness, percent pectin removed and residual percentage of starch has confirmed that the bio-preparation can be as effective as the conventional alkaline process. The results have shown that the presence of the wetting agents does not interfere in the enzymatic activity and also improves the hydrophilicity of the fabric. Sequestering agents has demonstrated a negative influence evidenced by a 9% of reduction in the activity for amylase enzyme and around a 11% in the activity for both cellulase and pectinase enzymes. The best results for the tests have been obtained for the conditions: using the sequestering agent after 30 minutes of the beginning of enzymatic reaction, 65°C, pH 6.5 and an enzymatic pool containing 66% of pectinase, 17% of amylase and 17% of cellulase enzymes, resulting in a decrease of 81% of pectin fabric content, an instantaneous hydrophilicity, around of 21°Berger degree of whiteness, and a residual starch between 0.10 and 0.14%. The combined presence of neutral cellulase enzyme and reactive dyes have not been affected the adherence of dyes on the cellulosic fiber, neither biopolish process was affected when performed in the presence of reactive dyes. Through tests performed on a pilot production machine using the proposed biopreparation process, it has been verified that the test results for strength, hairiness and pilling met the quality standards demanded by

the textile industry. The economic feasibility for the bio-preparation process has been also confirmed through a costs analysis.

**Keywords:** biopreparation, alkaline preparation, cellulase, amylase, pectinase, cotton fabric.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura morfológica esquemática da fibra de algodão.....	31
Figura 2	(a) $\beta$ -glicose (b) Fórmula estrutural da celulose.....	34
Figura 3	Aplicação enzimática em processos têxteis.....	36
Figura 4	Atuação das enzimas multicomponentes da celulase na estrutura da celulose.....	40
Figura 5	Estrutura dos corantes reativos: (a) Amarelo 145, (b) Vermelho 194, (c) Azul 221.....	49
Figura 6	Escala Tegewa utilizada para avaliação do grau de desengomagem.....	56
Figura 7	Tabela de padrões fotográficos de <i>pillig</i> .....	59
Figura 8	(1): Processo de biopreparação com adição de sequestrante no início do tratamento enzimático (a) tampão pH 6,5; (b) umectante; (c) enzimas; (d) sequestrante.....	65
Figura 9	(2): Processo de biopreparação com adição de sequestrante após tratamento enzimático (a) tampão pH 6,5; (b) umectante; (c) enzimas; (d) sequestrante..	66
Figura 9	Processo de preparação alcalina (a) NaOH; (b) peróxido de hidrogênio; (c) umectante; (d) sequestrante; (e) neutralizador de peróxido; (f) ácido acético.....	67
Figura 10	(1): Processo convencional de biopolimento e tingimento (a) tampão pH 6,5; (b) celulase (c) sal; (d) corante; (e) barrilha; (f) soda; (g) detergente; (h) ácido acético.....	69
Figura 10	(2): Processo biopolimento e tingimento simultâneos (a) tampão pH 6,5; (b) celulase (c) sal; (d) corante; (e) barrilha; (f) soda; (g) detergente; (h) ácido acético.....	69
Figura 11	Máquina Cotton Flow.....	70
Figura 12	Perfil eletroforético em SDS-PAGE das enzimas pectinase (1), celulase (2) e amilase (3), comparadas com marcadores de peso molecular (PM).....	72
Figura 13	Gráfico de Pareto dos efeitos estimados (valor absoluto) sobre a atividade da enzima pectinase.....	81
Figura 14	Relação entre valores observados e preditos do modelo cúbico para a atividade da pectinase.....	83
Figura 15	(a) e (b) Superfície de resposta do modelo cúbico	

	para a atividade da enzima pectinase em função da concentração das enzimas pectinase, amilase e celulase.....	84
Figura 16	Gráfico de Pareto dos efeitos estimados (valor absoluto) sobre a atividade da enzima amilase.....	88
Figura 17	Relação entre valores observados e preditos do modelo cúbico para a atividade da amilase.....	90
Figura 18	(a) e (b) Superfície de resposta do modelo cúbico para a atividade da enzima amilase em função da concentração das enzimas pectinase, amilase e celulase.....	91
Figura 19	Gráfico de Pareto dos efeitos estimados (valor absoluto) sobre a atividade da enzima celulase.....	94
Figura 20	Relação entre valores observados e preditos do modelo cúbico para a atividade da celulase.....	95
Figura 21	(a) e (b) Superfície de resposta do modelo cúbico para a atividade da enzima celulase em função da concentração das enzimas pectinase, amilase e celulase.....	96
Figura 22	Perfil para os valores preditos e desejabilidade para atividade das enzimas amilase, pectinase e celulase no pool enzimático.....	98
Figura 23	Resultados dos ensaios de perda de massa para as combinações enzimáticas testadas. Ensaios realizados a temperatura 55°C, pH 6,5, tempo reação 20 min.....	100
Figura 24	Resultados dos ensaios de hidrofiliidade para as combinações enzimáticas testadas. Ensaios realizados a temperatura 55°C, pH 6,5, tempo reação 20 min.....	100
Figura 25	Comparativo entre os resultados dos ensaios de perda de massa e hidrofiliidade para as combinações enzimáticas testadas. Ensaios realizados a temperatura 55°C, pH 6,5 e tempo de reação de 20 min.....	101
Figura 26	Resultados dos ensaios de grau de alvura para as combinações enzimáticas testadas. Ensaios realizados a temperatura 55°C, pH 6,5, tempo reação 20 minutos.....	103
Figura 27	Atividade enzimática em função do tempo de reação, temperatura entre 55-75°C, pH 6,5.....	109

Figura 28	Atividade enzimática em função do pH, temperatura entre 55-75°C, tempo de reação de 40 min.....	111
Figura 29	Atividade enzimática em função da temperatura, tempo de reação de 40 min., pH entre 5,5-7,5.....	112
Figura 30	Gráfico de Pareto dos efeitos estimados (valor absoluto) sobre a atividade da enzima pectinase.....	115
Figura 31	Gráfico de Pareto dos efeitos estimados (valor absoluto) sobre a atividade da enzima amilase.....	116
Figura 32	Gráfico de Pareto dos efeitos estimados (valor absoluto) sobre a atividade da enzima celulase.....	116
Figura 33	Relação entre valores observados e preditos do modelo quadrático para a atividade da pectinase.....	118
Figura 34	Relação entre valores observados e preditos do modelo quadrático para a atividade da amilase.....	119
Figura 35	Relação entre valores observados e preditos do modelo quadrático para a atividade da celulase.....	119
Figura 36	Superfície de resposta do modelo quadrático para a atividade da enzima pectinase em função do pH, temperatura e tempo de reação.....	120
Figura 37	Superfície de resposta do modelo quadrático para a atividade da enzima amilase em função do pH, temperatura e tempo de reação.....	121
Figura 38	Superfície de resposta do modelo quadrático para a atividade da enzima celulase em função do pH, temperatura e tempo de reação.....	121
Figura 39	Perfil para os valores preditos e desejabilidade para atividade das enzimas amilase, pectinase e celulase em função do pH, temperatura e tempo de reação.....	122
Figura 40	Resultado do efeito do umectante no processo de biopreparação. Ensaio realizado a pH 6,5, T=65°C, tempo de reação de 40 min, RB: 1:10.....	124
Figura 41	Resultado do efeito do sequestrante nos processos 1 e 2 de biopreparação. Ensaio realizado a pH 6,5, T=65°C, tempo de reação de 40 min, RB: 1:10.....	126
Figura 42	Força colorística dos tecidos alvejados e biopreparados.....	129
Figura 43	Rendimento tintorial do tecido alvejado nos processos de biopolimento e biopolimento e tingimento simultâneos.....	131
Figura 44	Rendimento tintorial do tecido biopreparado nos processos de biopolimento e biopolimento e	

	tingimento simultâneos.....	132
Figura 45	Concentração de fibras que se desprendem da toalha após processo de lavagem.....	134
Figura 46	Imagem dos testes de solidez da cor à luz, fricção e lavagem.....	135

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição percentual da fibra (total) e da parede primária com cutícula do algodão.....	33
Tabela 2	Características das enzimas utilizadas no trabalho....	48
Tabela 3	Propriedades dos corantes utilizados.....	48
Tabela 4	Reagentes para a preparação do gel de Poliacrilamida.....	53
Tabela 5	Valores de amido avaliados pela escala Tegewa.....	56
Tabela 6	Planejamento experimental de mistura.....	61
Tabela 7	Níveis dos parâmetros estudados para avaliar a influência do tempo de reação, pH e temperatura sobre a atividade enzimática.....	62
Tabela 8	Planejamento experimental 3 <sup>3</sup> utilizado para avaliar a influência dos parâmetros tempo de reação, pH e temperatura sobre a atividade enzimática.....	62
Tabela 9	Procedimento utilizado na biopreparação de tecido felpudo 100% CO, RB 1:10.....	64
Tabela 10	Procedimento utilizado para preparação alcalina de tecido felpudo 100% CO, RB 1:10.....	67
Tabela 11	Procedimento utilizado no tingimento e biopolimento convencional e simultâneo de tecido felpudo 100% CO, RB 1:10.....	68
Tabela 12	Quantificação de proteína e massa molecular das enzimas pectinase, celulase e amilase.....	71
Tabela 13	Valores médios reais e previstos das respostas medidas no planejamento de mistura, com cinco replicações para a determinação da melhor combinação enzimática sobre o <i>pool enzima</i> .....	74
Tabela 14	Estatística descritiva da atividade real da enzima pectinase.....	75
Tabela 15	Estatística descritiva da atividade real da enzima amilase.....	76
Tabela 16	Estatística descritiva da atividade real da enzima celulase.....	77
Tabela 17	ANOVA da atividade da enzima pectinase em função das combinações enzimáticas.....	78
Tabela 18	Análise de significância do modelo cúbico completo para atividade da enzima pectinase.....	79
Tabela 19	Coefficientes estimados no modelo cúbico para atividade da enzima pectinase com todos os termos..	80

Tabela 20	Análise de significância do modelo cúbico para atividade da enzima pectinase, após retirada dos efeitos não significativos.....	81
Tabela 21	Coefficientes estimados no modelo cúbico para atividade da enzima pectinase, após retirada dos efeitos não significativos.....	82
Tabela 22	ANOVA da atividade da enzima amilase em função das combinações enzimáticas.....	85
Tabela 23	Análise de significância do modelo cúbico para atividade da enzima amilase.....	86
Tabela 24	Coefficientes estimados no modelo cúbico para atividade da enzima amilase com todos os termos....	87
Tabela 25	Análise de significância do modelo cúbico para atividade da enzima amilase, após retirada dos efeitos não significativos.....	88
Tabela 26	Coefficientes estimados no modelo cúbico para atividade da enzima amilase, após retirada dos efeitos não significativos.....	89
Tabela 27	ANOVA da atividade da enzima celulase em função das combinações enzimáticas.....	92
Tabela 28	Análise de significância do modelo cúbico para atividade da enzima celulase.....	93
Tabela 29	Coefficientes estimados no modelo cúbico completo para atividade da enzima celulase com todos os termos.....	93
Tabela 30	Análise dos valores médios da perda de massa, hidrofiliidade, grau de alvura, residual de amido e pectina removida do tecido, com três replicações para a determinação da melhor combinação enzimática sobre o <i>pool enzimático</i> .....	104
Tabela 31	Análise econômica das combinações enzimáticas....	106
Tabela 32	Comparação entre os resultados dos processos de biopreparação e preparação alcalina.....	107
Tabela 33	Resposta do planejamento experimental $3^3$ utilizado para avaliar a influência do tempo de reação, pH e temperatura sobre a atividade enzimática.....	108
Tabela 34	Análise de Variância (ANOVA) da atividade da enzima pectinase.....	113
Tabela 35	Análise de Variância (ANOVA) da atividade da enzima amilase.....	113
Tabela 36	Análise de Variância (ANOVA) da atividade da	

	enzima celulase.....	114
Tabela 37	Coefficientes estimados no modelo quadrático para atividade da enzima pectinase, após retirada dos efeitos não significativos e ajuste do modelo.....	117
Tabela 38	Coefficientes estimados no modelo quadrático para atividade da enzima amilase, após retirada dos efeitos não significativos e ajuste do modelo.....	117
Tabela 39	Coefficientes estimados no modelo quadrático para atividade da enzima celulase, após retirada dos efeitos não significativos e ajuste do modelo.....	118
Tabela 40	Resultados obtidos experimentalmente para as três enzimas.....	123
Tabela 41	Efeito do agente umectante na biopreparação.....	125
Tabela 42	Efeito do agente sequestrante na biopreparação.....	126
Tabela 43	Efeito do agente sequestrante após 30 min de reação enzimática.....	127
Tabela 44	Resultados dos procedimentos experimentais para substratos alvejados e biopreparados.....	128
Tabela 45	Resultados dos procedimentos experimentais para substratos alvejados e biopreparados com o processo de biopolimento.....	130
Tabela 46	Resultados de <i>pillling</i> , pilosidade e hidrofiliidade final.....	133
Tabela 47	Resultados de solidez da cor à luz, fricção e lavagem.....	134
Tabela 48	Análise do tempo de processo.....	136
Tabela 49	Análise da quantidade de água utilizada nos processos.....	136
Tabela 50	Custo dos insumos químicos para os processos estudados.....	137
Tabela 51	Custo de 1 partida em máquina de capacidade de 330 Kg de tecido comparando o processo convencional com o novo processo.....	137



## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
1.1 MOTIVAÇÃO DO TRABALHO.....	26
1.2 CONTRIBUIÇÕES DO TRABALHO.....	26
1.3 OBJETIVOS.....	27
1.3.1 Objetivos Específicos.....	27
<b>CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>29</b>
2.1 INDÚSTRIA TÊXTIL.....	29
2.1.1 Processo de Produção Têxtil.....	30
2.1.2 Aplicações Biotecnológicas no Algodão.....	30
2.1.2.1 Algodão.....	30
2.1.2.2 Biopreparação.....	34
2.1.2.3 Desengomagem Enzimática.....	35
2.1.2.4 Biopolimento.....	35
2.2 ENZIMAS UTILIZADAS NA INDÚSTRIA TÊXTIL...	36
2.2.1 Amilases.....	37
2.2.2 Pectinases.....	38
2.2.3 Celulases.....	39
2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A AÇÃO ENZIMÁTICA EM FIBRAS CELULÓSICAS.....	41
2.3.1 Sinergismo entre Enzimas.....	41
2.3.2 Efeito de Agentes Químicos na Atividade Enzimática – Inibição ou Ativação.....	42
2.3.3 Influência do pH e Temperatura.....	43
2.3.4 Tempo de Processo.....	45
2.3.5 Presença de Corantes.....	45
2.3.6 Considerações Finais.....	46
<b>CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
3.1 MATERIAIS.....	47
3.1.1 Substrato Têxtil.....	47
3.1.2 Enzimas.....	47
3.1.3 Corantes.....	48
3.1.4 Reagentes.....	49
3.1.5 Equipamentos.....	50
3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	50
3.2.1 Caracterização das Preparações Enzimáticas.....	50
3.2.1.1 Determinação da Quantidade de Proteínas.....	50
3.2.1.2 Determinação de Açúcares Redutores.....	51

3.2.1.3	Determinação da Atividade da Pectinase.....	51
3.2.1.4	Determinação da Atividade da Amilase.....	52
3.2.1.5	Determinação da Atividade da Celulase.....	52
3.2.1.6	Caracterização Enzimática em Gel de Eletroforese (SDS-PAGE).....	53
3.2.2	Tratamentos dos Tecidos Felpudos de Algodão.....	54
3.2.2.1	Hidrofilidade.....	54
3.2.2.2	Grau de Alvura.....	54
3.2.2.3	Perda de Massa.....	55
3.2.2.4	Determinação de Pectina Removida.....	55
3.2.2.5	Determinação do Residual de Amido.....	55
3.2.2.6	Caracterização do Comportamento Tintorial.....	56
3.2.2.7	<i>Pilling</i> e Pilosidade.....	57
3.2.2.8	Solidez da Cor à Fricção.....	58
3.2.2.9	Solidez da Cor à Luz.....	59
3.2.2.10	Solidez da Cor à Ação da Lavagem.....	59
3.3	PROPRIEDADES CATALÍTICAS DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS.....	60
3.3.1	Estudo do Pool Enzimático.....	60
3.3.2	Influência da Temperatura, Tempo de Reação e pH na Atividade Enzimática.....	60
3.3.3	Efeito de Agentes Químicos na Atividade Enzimática....	60
3.4	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ESTATÍSTICO.....	61
3.5	PROCESSOS UTILIZADOS.....	63
3.5.1	Biopreparação.....	64
3.5.2	Preparação Alcalina.....	66
3.5.3	Processo de Tingimento e Biopolimento.....	67
3.5.4	Ensaio Piloto.....	70
	<b>CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
4.1	Caracterização Enzimática.....	71
4.1.1	Quantificação de Proteínas e Eletroforese.....	71
4.1.2	Estudo do Pool Enzimático composto por Amilase, Pectinase e Celulase.....	73
4.1.2.1	Resultados de Perda de Massa, Hidrofilidade, Grau de Alvura, Remoção de Pectina e Residual de Amido.....	98
4.2	Atividade Enzimática em Função do Tempo de Reação, pH e Temperatura.....	107
4.3	Efeito de Agentes Químicos.....	123

4.3.1	Efeito do Umectante no Processo de Biopreparação.....	124
4.3.2	Efeito do Sequestrante no Processo de Biopreparação....	125
4.4	Resultados do Comportamento Tintorial.....	128
4.4.1	Avaliação da Influência do Pré-tratamento no rendimento do tingimento.....	128
4.4.2	Avaliação da Eficiência do Biopolimento e Tingimento na Presença da Celulase.....	129
4.5	Ensaio em Escala Piloto.....	132
4.5.1	Análise dos Resultados de Solidez da Cor, <i>Pilling</i> , Pulosidade e Hidrofilidade.....	133
4.5.2	Análise Econômica dos Processos Estudados.....	135
<b>CAPITULO 5 – CONCLUSÕES.....</b>		<b>139</b>
<b>CAPITULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>		<b>141</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>		<b>143</b>



## SIMBOLOGIA

A	= Absorbância
°Berger	= Unidade de medida do grau de branco
$\beta$ G	= $\beta$ -glucosidase, celobiase, $\beta$ -(1,4)-glicose
C	= Concentração de açúcar [mmol/mL]
CBD	= Cellulose Binding Domain
CBH	= Celobiohidrolase, $\beta$ -(1,4)-D-glucana celobiohidrolase
CMCase	= Carboximetilcelulase
CO	= Algodão
D	= Diluição da amostra
DNS	= Ácido 3,5 dinitro-salicílico
E.C.	= Enzyme Commission
EG	= Endoglucanase b-(1,4)-D-glucana-celobiohidrolase
EGU	= Unidades de atividade de endoglucanase
<i>m1</i>	= Massa do corpo de prova antes da extração ou antes do tratamento [g]
<i>m2</i>	= Massa do corpo de prova após a extração ou após o tratamento [g]
RB	= Relação de banho
rpm	= Rotação por minuto
t	= Tempo de incubação [minuto]
T	= Temperatura [°C]
U	= Unidade de atividade enzimática [ $\mu$ mol/mL.min.]
V	= Volume de enzima [mL]



## CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

A produção de enzimas teve um grande aumento de escala e consequente redução de custo, permitindo que atualmente seu uso esteja disseminado em diversos segmentos industriais. Na indústria têxtil, o uso de processos enzimáticos tem se tornado cada vez maior, especialmente visando a substituição de produtos químicos agressivos ao meio ambiente, reduzindo consideravelmente o impacto ambiental, assim como os danos às fibras (DHIMAN *et al.*, 2008).

Os avanços na biotecnologia possibilitaram a utilização de enzimas para aplicações específicas. Por exemplo, foram desenvolvidas as amilases para processos de desengomagem em temperaturas próximas a 100°C. Além das enzimas hidrolíticas como as celulases, amilases, pectinases e proteases, outras enzimas como as oxidoredutases, têm se revelado ferramentas poderosas em várias etapas do processamento de produtos têxteis (GUBITZ, 2003).

A utilização de enzimas no processo têxtil, visando a remoção das impurezas não celulósicas, denomina-se biopreparação, biopurga ou do inglês “bioscouring” e apresenta vantagens como a necessidade de temperaturas menores no processo, contribuindo com a redução do consumo de energia, além da contribuição para o melhoramento ecológico do processo, como mencionado anteriormente. As enzimas utilizadas no processo melhoram a qualidade das fibras, pois são altamente específicas, permitindo a produção de produtos acabados de melhor qualidade com relação ao aspecto visual, toque e propriedades de resistência, reduzem o desgaste do equipamento e conferem maior flexibilidade na sua utilização, possibilitam economia de energia, requerem maior controle do processo e promovem aumento de produtividade (CUNHA *et al.*, 2000).

Vários trabalhos relacionados ao uso de enzimas em material 100% algodão são encontrados na literatura. Sangwatanaroj *et al.* (2003) estudaram o processo de preparação com diferentes tipos de enzimas como pectinases, lipases, proteases e celulases. Comparando os resultados com o processo alcalino convencional, os autores obtiveram o mesmo grau de branco para tecidos em malha. Estudos com uma pectinase alcalina e celulases em substrato 100% algodão também têm sido amplamente difundidos (Hebeish *et al.*, 2009; Shafie *et al.*, 2009). Oner e Sahinbaskan (2011) propuseram o processo de tingimento e preparação de tecidos de malha 100% algodão em um único processo, onde foram utilizadas as enzimas amilase, pectinase e catalase, aplicadas em tempos diferentes.

Atualmente o uso de enzimas tem se aplicado de forma separada no processo têxtil, onde cada enzima é utilizada em uma etapa do processo ou são aplicadas em um único banho, porém em tempos diferentes. No entanto, pode-se otimizar ainda mais o processo têxtil, principalmente em economia de água, tempo e energia, através da utilização de um *pool enzimático*. O objetivo deste trabalho é avaliar a possibilidade do uso de uma combinação sinérgica de enzimas para aplicação combinada e simultânea na biopreparação, em tecidos felpudos 100% algodão, e avaliação da relação celulase-corante no tingimento (biopolimento e tingimento simultâneos) de cores médias a escuras.

## 1.1. MOTIVAÇÃO DO TRABALHO

Os processos enzimáticos apresentam-se como uma alternativa aos processos tradicionais, devido às seguintes vantagens: possuem elevada especificidade aos compostos que devem ser removidos das fibras de algodão cru; atuam em temperaturas menores (50-60°C), em relação ao processo de preparação tradicional, que se situam na faixa de 80-95°C, diminuindo o consumo de energia; a aplicação de enzimas no processo de preparação (biopreparação) possibilitaram a obtenção de características muito próximas do processo convencional, adicionalmente é um processo ecologicamente mais favorável e implica na menor danificação na estrutura das fibras celulósicas; possibilidade de reuso do banho enzimático, resultando em economia de insumos como água, energia e produtos químicos; menor impacto ambiental do efluente do processo enzimático devido à redução da carga de produtos químicos em relação ao processo convencional.

Um dos grandes desafios em utilizar enzimas em tecidos felpudos é a formação de “pó”, pequenas fibrilas que se soltam do artigo têxtil em lavações posteriores, gerando grandes problemas de qualidade, consequentemente ocasionando alto número de reclamações dos consumidores.

## 1.2. CONTRIBUIÇÕES DO TRABALHO

- a) As principais contribuições do presente trabalho são: determinar a viabilidade técnico-econômica da utilização do *pool enzimático* celulase, pectinase e amilase, na biopreparação de tecidos felpudos de algodão, através da caracterização quanto a sua atividade em diferentes condições de processo (pH,

temperatura e tempo de processo) e melhor combinação entre as enzimas, comparando os resultados da biopreparação com o processo de alvejamento convencional em relação à perda de massa, hidrofiliidade, grau de alvura, remoção de substâncias pécnicas e amido.

- b) Avaliar o desempenho de uma celulase neutra e dos corantes na etapa de tingimento, verificando a eficácia do tingimento e biopolimento.

### **1.3. OBJETIVOS**

O objetivo geral do presente trabalho é a determinação das melhores condições operacionais da ação combinada e simultânea das enzimas celulase, amilase e pectinase provenientes de produtos comerciais para aplicação na biopreparação de tecidos felpudos de algodão. Na etapa de tingimento do artigo têxtil será utilizada uma celulase neutra, produzida pela Novozymes, onde será avaliado o processo de biopolimento e tingimento simultâneos.

#### **1.3.1. Objetivos Específicos**

- Determinar qual a melhor combinação entre as enzimas pectinase, amilase e celulase na etapa de biopreparação.
- Caracterizar as enzimas pectinase, amilase e celulase quanto à sua atividade em diferentes tempos de processo, pH e temperatura, na ação combinada.
- Quantificar e comparar resultados dos tecidos tratados enzimaticamente na biopreparação (remoção de substâncias pécnicas, remoção de amido, hidrofiliidade, grau de alvura e perda de massa) com o processo alcalino convencional.
- Determinar um grau de alvura para o tingimento de cores médias a escuras.
- Avaliar dois processos de biopreparação, primeiramente com a adição de agente sequestrante e umectante no início do processo e outro após a reação enzimática.
- Avaliar a influência do pré-tratamento no rendimento do tingimento.
- Avaliar a eficiência do tingimento e biopolimento na ausência e presença de uma celulase neutra, através das análises de cor no sistema CIELab e testes de *pilling* e formação de pó (pilosidade).

- Avaliar a solidez da cor à fricção (seco e úmido), solidez à luz, solidez à lavagem e hidrofiliidade final, através de análises das amostras de tecido de algodão submetidas aos tratamentos enzimáticos.
- Realizar testes em escala piloto de produção.
- Determinar a viabilidade técnico-econômica da utilização do novo processo enzimático em relação ao processo têxtil convencional.

## **CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

O tratamento enzimático de tecidos requer o conhecimento de características das fibras, como a ausência ou presença de componentes nas fibras celulósicas maduras de algodão, características das enzimas, como especificidade, atividade; dos parâmetros operacionais, como: temperatura, pH, agitação mecânica, concentração de enzimas, a eficiência do processo enzimático, considerando interferentes que podem inativar as enzimas, quando estas são aplicadas de forma combinada.

Neste capítulo, será apresentada uma revisão da literatura sobre os processos enzimáticos empregados no beneficiamento de fibras celulósicas, especificamente algodão e as características gerais das enzimas, amilase, pectinase e celulase, que podem ser utilizadas nos processos de beneficiamento têxtil.

### **2.1. INDÚSTRIA TÊXTIL**

A indústria têxtil desempenha um papel importante na economia de muitos países. No Brasil, esta indústria se destaca entre os oito setores mais importantes da atividade industrial, ocupando os primeiros lugares em empregos diretos e em faturamento. Embora as diferenças tecnológicas entre as pequenas e grandes indústrias sejam bastante significativas, todas têm em comum a particularidade de utilizar grandes quantidades de água. Este fato, associado ao baixo aproveitamento dos insumos (corantes, detergentes, engomantes, amaciantes, etc.), faz com que a indústria têxtil seja responsável pela geração de grandes volumes de resíduos, com elevada carga orgânica e forte coloração (SOUZA e PERALTA-ZAMORA, 2005).

A aplicação de enzimas na indústria têxtil iniciou-se no século XX. É uma tecnologia com baixo impacto ambiental e por isso, objeto de estudo aprofundado. As primeiras aplicações enzimáticas na indústria têxtil consistiam na modificação química da superfície da fibra do algodão, de modo a melhorar as suas propriedades, por remoção de componentes indesejáveis adsorvidos como gorduras, ceras, proteínas, etc. Outro exemplo é o biopolimento dos tecidos de algodão para obter o efeito “stone-washing”. As enzimas celulases são usadas no acabamento dos tecidos de algodão, melhorando as propriedades de toque e o efeito de conforto (GUBITZ, 2001).

O processamento enzimático do algodão pode ser dividido em: desengomagem enzimática, biopreparação ou biopurga, bioacabamento

ou biopolimento. Quando o processo enzimático é aplicado ao Denim (ou jeans), tem-se ainda a bioestonagem.

### **2.1.1. Processo de Produção Têxtil**

A indústria têxtil tem como objetivo a transformação de fibras em fios, de fios em tecidos e de tecidos em peças que serão comercializadas.

A cadeia têxtil é formada pelos setores de fiação, tecelagem ou malharia, beneficiamento e confecção.

As fibras têxteis podem ser divididas em três grandes grupos denominados fibras naturais, artificiais e sintéticas. As fibras naturais mais utilizadas são constituídas de celulose e proteína, como lã, seda, algodão e linho. As fibras sintéticas são comercializadas como poliamida, poliéster e acrílico, e as fibras artificiais são produzidas pelo homem, porém utilizando como matéria-prima produtos da natureza, como a celulose, as mais conhecidas são a viscose e o acetato (GUARATINI e ZANONI, 2000).

A fiação é a etapa em que as fibras têxteis são transformadas em fios. A tecelagem é a etapa de transformação dos fios em tecidos planos. A malharia é a etapa de transformação dos fios em tecidos de malha. O beneficiamento é a etapa de preparação do tecido para seu uso final, podendo envolver os processos de tingimento, estampagem e acabamento. A confecção é a etapa de fabricação dos artigos têxteis que serão colocados à disposição dos consumidores nos pontos de venda.

### **2.1.2. Aplicações Biotecnológicas no Algodão**

A principal fibra utilizada na indústria têxtil é o algodão, constituído por celulose, pectinas, proteínas, ceras entre outros compostos, visto que as oportunidades de aplicação de enzimas nesta indústria são numerosas.

#### **2.1.2.1. Algodão**

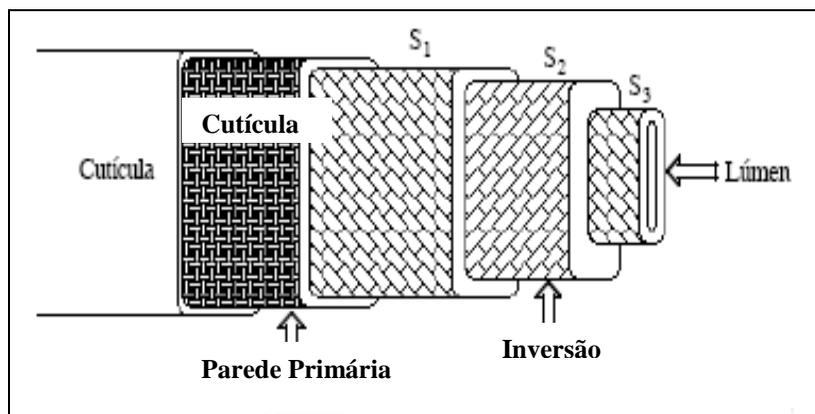
O algodão é uma fibra natural de origem vegetal. As suas fibras derivam da semente da planta do gênero *Gossypium*. Existem diferentes variabilidades de algodão, que dependem da sua origem geográfica e do seu grau de maturidade (TROTMAN, 1968; GUILLEN e GARRIDO, 1987).

### *Estrutura Morfológica do Algodão*

As fibras de algodão têm uma estrutura multifibrilar ao longo do comprimento, apresentando diversas camadas consecutivas (Figura 1) cujo corte transversal se assemelha à forma de um "feijão" (GUILLEN e GARRIDO, 1987; NEVELL e ZERONIAN, 1985).

A cutícula é uma parede fina exterior, não celulósica, constituída por ceras, gorduras, proteínas e pectinas (GUILLEN e GARRIDO, 1987).

A parede primária é constituída por celulose (>50%), contendo também proteínas, pectinas e ceras. Um exame no microscópio eletrônico mostra que as fibrilas exteriores desta camada são paralelas ao eixo da fibra e formam, com as interiores, uma rede aproximadamente ortogonal (GUILLEN e GARRIDO, 1987; NEVELL e ZERONIAN, 1985).



**Figura 1:** Estrutura morfológica esquemática da fibra de algodão. Fonte: GUILLEN e GARRIDO, 1987.

A parede secundária, essencialmente celulósica, é a mais espessa e cristalina de todas e é composta pela camada  $S_1$ , exterior e pela  $S_2$ , interior. Em  $S_1$  os feixes de fibrilas estão dispostos helicoidalmente ao redor da fibra, formando com o seu eixo um ângulo de 20-35°. Em  $S_2$  observa-se ainda que os feixes de fibrilas têm inversões no sentido do enrolamento, a camada  $S_2$  constitui cerca de 95% do peso da fibra. A secção transversal de uma fibra de algodão inchada com soda cáustica mostra uma série de anéis concêntricos, devido ao aumento de volume de  $S_2$ . O número destes anéis pode ser

correlacionado com o número de dias de crescimento da fibra de algodão (GUILLEN e GARRIDO, 1987; NEVELL e ZERONIAN, 1985).

A parede terciária,  $S_3$ , ou parede do lúmen, praticamente só se observa em fibras de algodão muito maduras. Nesta camada a disposição do feixe de fibrilas é similar a  $S_1$ , sendo assim distinto da camada  $S_2$ . O lúmen, que constitui a parte mais interior das fibras de algodão, é composto por ceras, pectina e restos de protoplasma.

### *Fibra de Algodão*

Fecundada a flor do algodoeiro, a fibra de algodão desenvolve-se na epiderme (parede mais externa) da semente. Cada fibra é formada por uma célula simples dessa epiderme que se alonga (1 mm/dia) até seu tamanho final. Cada semente pode conter de 7.000 a 15.000 fibras individuais.

O crescimento pode variar de 50 a 70 dias (da fecundação à abertura das maçãs). Para produzir o fio de algodão a fibra deve apresentar comprimento necessário, uniformidade, resistência, finura e pureza (limpeza).

### *Composição Química da Fibra de Algodão*

Quimicamente, as fibras de algodão são constituídas por celulose pura, contendo pequena porcentagem de impurezas, na sua maioria localizadas na superfície externa das fibras, tais como ceras, pectinas, ácidos orgânicos, proteínas, polissacarídeos não celulósicos e cinzas, como também substâncias lignificadas. A quantidade total de impurezas depende da origem do algodão e da maturidade das fibras. Essas impurezas devem ser removidas antes da tinturaria e do acabamento, pois a presença destas impurezas limita fortemente a absorção de água e alvura das fibras de algodão (HOONDAL *et al.*, 2002).

Segundo Maluf e Kolbe (2003) as variações de composição nas fibras naturais dependem de muitos fatores, relacionados com a origem, por exemplo, as fibras vegetais têm a composição alterada por fatores genéticos (diferentes cultivares), climáticos, solo e beneficiamento. A Tabela 1 apresenta a composição da parede primária com cutícula e a fibra como um todo.

**Tabela 1:** Composição percentual da fibra (total) e da parede primária com cutícula do algodão.

Componente	Composição em base seca (%)	
	Fibra total	Parede primária
Celulose	88-96	52
Pectinas	0,7-1,2	12
Proteínas	1,1-1,9	7
Ceras	0,4-1,0	12
Açúcares	0,2-0,3	3
Cinzas	0,7-1,6	14
Outros componentes orgânicos	0,5-1,0	-

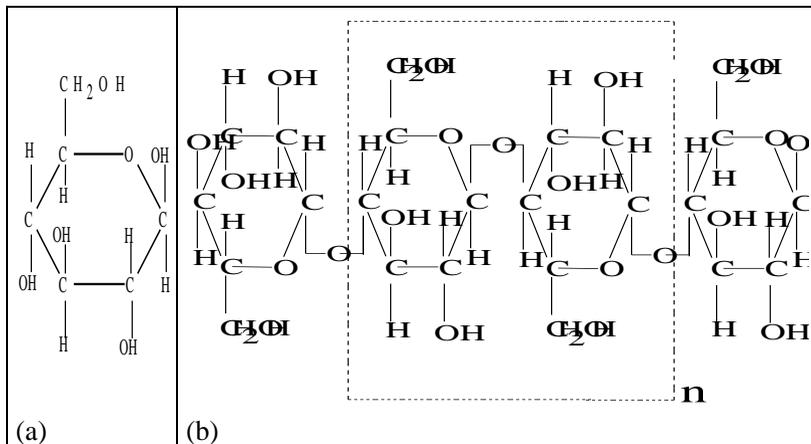
Fonte: MALUF e KOLBE, 2003.

### Celulose do Algodão

A celulose, ao nível molecular, é um polímero de unidades moleculares de D-glucose, ligadas entre si por ligações glicosídicas tipo  $\beta$ -(1,4). Da hidrólise da celulose obtêm-se polímeros menores, oligossacáridos com terminações redutoras e não redutoras que, após hidrólises mais extensas, decompõem-se dando origem a celobiose (dissacarídeo) e a glicose (GUILLEN e GARRIDO, 1987; NEVELL e ZERONIAN, 1985).

As fibras de celulose são formadas por regiões cristalinas, as quais são resistentes à ação das enzimas, e amorfas, porção hidrolisável por enzimas. A celulose misturada com emulsão enzimática sofre quebra nas ligações glicosídicas  $\beta$ -(1,4), gerando celobiose (composta por duas unidades glicosídicas). Isto indica que as unidades de glicose possuem configuração  $\beta$ , portanto, as ligações entre os grupos hidroxila nas posições 1:4, gira cada unidade em um ângulo de  $180^\circ$  (TROTMAN, 1984; DA-SILVA *et al.*, 1997).

A Figura 2 (a) apresenta a configuração  $\beta$ -glicose e a Figura 2 (b) a estrutura da celulose.



**Figura 2:** (a)  $\beta$ -glicose (b) Fórmula estrutural da celulose. Fonte: TROTMAN, 1984.

A celulose nativa difere em sua cristalinidade quanto à localização na parede celular, pois a camada secundária contém celulose altamente cristalina enquanto a camada primária contém principalmente celulose amorfa.

### 2.1.2.2. Biopreparação

Na biopreparação são eliminadas as impurezas não celulósicas do algodão com enzimas como as pectinases, para remoção da pectina; proteases para proteínas; lipases para os óleos e ceras, etc. Como alguns pigmentos naturais não podem ser desprendidos da fibra, por estarem associados às impurezas, a remoção das mesmas, retira esses pigmentos, reduzindo o amarelado da fibra (HOONDAL *et al.*, 2002).

A fervura alcalina, “purga”, e o alvejamento do algodão envolvem o uso de elevadas concentrações de álcali, peróxido de hidrogênio e outras substâncias químicas auxiliares, combinados com elevadas temperaturas para assegurar a eficiente remoção das impurezas antes do tingimento. Estes processos podem causar a despolimerização da celulose e perdas significativas de peso e resistência dos artigos (BUSCHLE-DILLER *et al.*, 1994; LI e HARDIN, 1998).

Usando diferentes tipos de enzimas em um mesmo banho de tratamento pode-se observar o efeito de sinergismo no processo de biopreparação. Pectinases e celulasas são aplicadas juntas na maioria dos tratamentos. O tratamento combinado melhora as propriedades de

molhabilidade do tecido e reduz as quantidades de enzimas utilizadas (FREITAS, 2009; LI e HARDIN, 1998). As celulasas melhoram a ação das pectinases devido ao melhor acesso da enzima ao composto pectico no material têxtil.

A combinação de enzimas específicas para remover as impurezas não-celulósicas no algodão permite manter inalterada a estrutura da celulose e reduz o consumo de energia, pois o tratamento enzimático exige temperaturas menores que o processo convencional (AXT-MARTINELLI, 2002).

### **2.1.2.3. Desengomagem Enzimática**

O processo de desengomagem é uma etapa preliminar e essencial no processamento de tecidos de algodão. A engomagem feita previamente visa garantir a resistência ao cisalhamento e esforços no processo de tecelagem, sem excessiva ruptura de fios. Este processo consiste na aplicação de uma solução de recobrimento natural (amido) ou sintética (acrilatos). Após a formação do tecido, esta goma deve ser removida. No processo convencional são utilizados ácidos ou agentes oxidantes como persulfatos (de sódio, amônio ou potássio) ou peróxido de hidrogênio em meio fortemente alcalino a altas temperaturas. Para evitar os danos causados no processo de desengomagem pela redução da resistência dos tecidos devido à degradação da fibra, são utilizadas amilases para a remoção da goma de amido. A eficiência da desengomagem enzimática depende do teor de amilase, temperatura, pH e condições de lavagem no final do processo (MALUF e KOLBE, 2003).

### **2.1.2.4. Biopolimento**

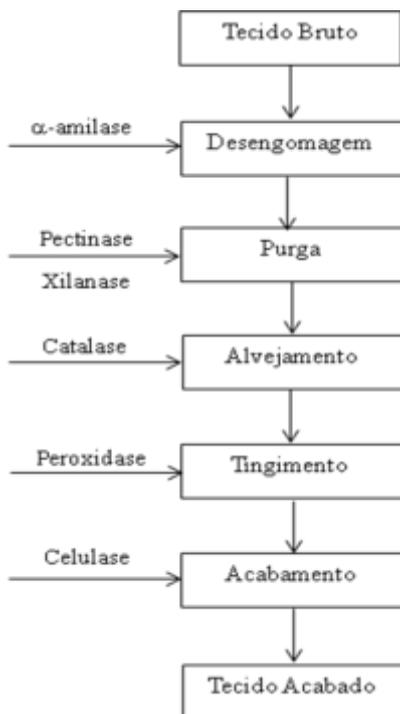
O biopolimento foi introduzido inicialmente com o objetivo de fornecer ao tecido de algodão uma aparência mais limpa, suave e um toque mais agradável. É essencialmente um processo com ação degradativa, resultando um tecido com menor peso e resistência. Estas perdas devem ser apenas moderadas e por isso há necessidade de controlar as condições do processo.

Além da perda de peso e de resistência dos artigos têxteis, a formação de “pós”, fragmentos de fibras resultantes da clivagem enzimática da celulose, também pode provocar problemas de qualidade ao produto final. O fino pó de algodão formado no processo de acabamento pode causar problemas aos operários, se não for

devidamente removido. A utilização de enzimas no processo de acabamento produz artigos têxteis com um maior conforto ao uso, como maciez ao toque, reduzida tendência a *pillling* e aumento do brilho (LIPP-SYMONOWICZ *et al.*, 2004; PERE *et al.*, 2001; VANHANEN *et al.*, 2000; YINGLING, 2000).

## 2.2. ENZIMAS UTILIZADAS NA INDÚSTRIA TÊXTIL

Enzimas podem ser aplicadas durante as etapas de preparação, após ou simultaneamente ao tingimento e acabamento na produção têxtil para facilitar a remoção de impurezas naturais, ou impostas, além de ajudar a modificar as propriedades físicas dos artigos têxteis. A Figura 3 apresenta as etapas no processamento têxtil na qual as enzimas podem ser utilizadas.



**Figura 3:** Aplicação enzimática em processos têxteis. Fonte: GUBITZ, 2001; KIRK *et al.*, 2002.

Aplicações enzimáticas podem ajudar na redução dos tempos de processos, na desengomagem, biopreparação e biopolimento, sendo os resultados comparados aos processos convencionais, tendo-se destacado como uma tecnologia que proporciona pleno suporte à indústria têxtil nesta atual tendência em reduzir as condições agressivas dos processos, além de proporcionar inovação com excelente custo-benefício, melhorando a qualidade dos artigos têxteis e em total acordo com as regulamentações ambientais (GUBITZ, 2001; ALY *et al.*, 2004).

### **2.2.1. Amilases**

As amilases são uma boa alternativa para a remoção de gomas à base de amido, por despolimerização da cadeia, tornando-se solúvel e susceptível à eliminação por lavagem a quente ou à base de soluções alcalinas. Vários tipos de amilases podem ser utilizadas para esse fim, sendo que as amilases bacterianas e, especialmente as termotolerantes, encontram maior aplicação comercial.

Amilases são responsáveis pela degradação da molécula de amido que estão amplamente distribuídas na natureza. O amido é o mais importante polissacarídeo de reserva do reino vegetal. Possui em sua constituição amilose (25 a 30%) e amilopectina (75 a 70%). Amilose é um polímero linear constituído de cerca de 6.000 unidades de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4. Amilopectina consiste de pequenas cadeias laterais de 15 a 45 unidades de glicose unidas por ligações do tipo  $\alpha$ -1,6 à cadeia de amilase (MANSUR, 2006; SPIER, 2005).

As amilases são divididas em dois grupos, as endo e exoamilases. As endoamilases catalisam hidrólises de forma aleatória no interior da molécula do amido, essa ação causa a quebra das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 presentes na parte interna (endo) das cadeias de amilose ou amilopectina e a formação de ramos lineares de oligossacarídeos de cadeias de vários comprimentos. A  $\alpha$ -amilase (E.C. 3.2.1.1) é a endoamilase mais conhecida a qual libera maltose, glicose e dextrina na hidrólise. As exoamilases hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 nos terminais da cadeia, como a  $\beta$ -amilase (E.C. 3.2.1.2) ou ambas as ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6, como a amiloglicosidase (E.C. 3.2.1.3) e glicosidase (E.C. 3.2.1.20) (ASQUIERI, 2007; SPIER, 2005).

### 2.2.2. Pectinases

As substâncias pécicas podem ser degradadas por enzimas pectinolíticas, produzidas em diferentes combinações pelas plantas e micro-organismos como fungos, leveduras e bactérias. Na indústria têxtil é utilizada na etapa de biopreparação do tecido, catalisando rapidamente a hidrólise e a solubilização das pectinas sob circunstâncias alcalinas suaves (ALMEIDA *et al.*, 2005; KAUR *et al.*, 2004; LIMA *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2005).

A classificação das enzimas pécicas está baseada no ataque ao esqueleto galacturônico, pela preferência de substrato (pectina, ácido pécico ou protopectina), ação por transeliminção ou hidrólise e por clivagem randômica (enzima endo-, liquidificante ou despolimerizante) ou terminal (enzima exo- ou sacarificante) (KASHYAP *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2005).

Em algodão cru, a remoção de pectina, cera e agentes de goma com a utilização de pectinases em conjunto com as amilases, lipases e hemicelulases em condições adequadas, substitui o uso de soda cáustica e gera produtos de alta qualidade, para posterior tingimento com menor consumo de energia (SAWADA e UEDA, 2001). Os melhores resultados têm sido obtidos com pectinase ou pectinase em combinação com celulase. Uma pectinase alcalina provou ser especialmente efetiva. Isso porque a pectina age como uma cola na parede primária das células de algodão. Após a ação da pectinase ocorre a desestabilização da estrutura da pectina e os diferentes componentes presentes na parede primária podem ser removidos facilmente em uma subsequente etapa de lavagem (GERHARTZ, 2004).

A adição de celulases totais ao banho de biopreparação tem demonstrado o aumento da eficiência de pectinases. Acredita-se que as celulases eliminam as impurezas indesejáveis pela hidrólise da celulase subjacente, porém o dano típico das celulases às fibras pode ocorrer (AXT-MARTINELLI, 2001).

Kalantzi *et al.* (2008) estudaram o efeito da pectato liase na biopreparação de tecidos de algodão e observaram que o grau de umectação, brancura, índice de cristalinidade e o comportamento do tingimento foram mais efetivos que o processo alcalino convencional.

### 2.2.3. Celulases

As celulases mais estudadas e usadas são produzidas por fungos como *Aspergillus niger*, *Humicola insolens*, *Penicillium funiculosum* e *Trichoderma reesei* e são enzimas extracelulares, o que facilita a obtenção industrial por fermentação (ANDREAUS, 2001).

Muitas celulases são compostas por dois domínios distintos: o domínio de ligação ao substrato (DLS), ou “*Cellulose Binding Domain – CBD*”, e o domínio catalítico (DC), que abriga o sítio ativo. Estes domínios estão ligados um ao outro através de uma cadeia polipeptídica flexível. O sítio ativo possui como função a hidrólise das ligações glicosídicas da celulose e cada classe de celulase possui uma forma diferente de sítio ativo, permitindo a hidrólise de ligações localizadas em regiões distintas do substrato. A função do domínio de ligação ao substrato está associada à adsorção, que permite o aumento da concentração das celulases na superfície da celulose através de interações não-covalentes, envolvendo ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas (ANDREAUS, 2001; HEIKINHEIMO *et al.*, 2000).

A produção de jeans com aparência envelhecida (stonewashed) com uso de celulases é o mais bem sucedido processo enzimático que surgiu na indústria têxtil na última década. Biopolimento representa outra aplicação de celulases para tecidos de celulose, a ação de celulases remove microfibrilas salientes da superfície do tecido (CAVACO-PAULO, 1998).

O uso das celulases tem aumentado na indústria têxtil. Conforme a atividade e o pH podem ser classificadas em: ácidas, cujo pH de atuação varia entre 4,5-5,5 e a temperatura entre 45-55°C; neutras, pH 5,5-8,0 e temperatura 50-60°C e as alcalinas que são utilizadas em detergentes. A mistura de celulases ácidas e neutras são conhecidas como celulases “híbridas”. Nestes processos é sempre empregada forte ação mecânica nos tecidos. O nível de agitação mecânica aumenta a perda de massa do tecido e afeta diferentemente as atividades relativas da endoglucanase (EG) e celobiohidrolase (CBH) na mistura bruta total (CAVACO-PAULO, 1998; ANDREAUS, 2001).

O modo de ação e a especificidade das diferentes celulases são geralmente reconhecidos pela existência de três tipos de celulases nos sistemas completos: celobiohidrolase, endoglucanase e celobiase.

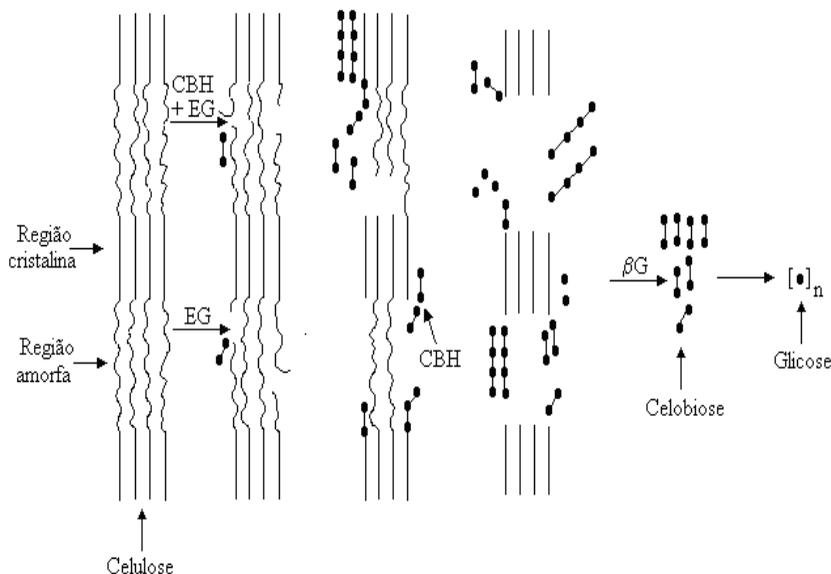
As celobiohidrolases ( $\beta$ -(1,4)-D-glucan celobiohidrolase, E.C: 3.2.1.91) liberam a celobiose da extremidade não reduzida e podem

também atuar na celulose cristalina (CHANZY e HENRISSAT, 1985; HEIKINHEIMO, 2002).

As endoglucanases ( $\beta$ -(1,4)-D-glucana 4-glucanohidrolase, E.C: 3.2.1.4) quebram as ligações internas nas regiões amorfas, de forma aleatória, liberando celo-oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização e celobiose. Também liberam terminais livres para a ação da exoglucanase (HEIKINHEIMO, 2002; VRSANSKÁ e BIELY, 1993).

As Celobiasas ( $\beta$ -D-Glucosidase glucohidrolase, E.C: 3.2.1.21) liberam glicose da celobiose e celo-oligossacarídeos de cadeia curta (celodextrinas). Existem ainda as exoglucanases (EGX,  $\beta$ -(1,4)-D-glucana celobiohidrolase, E.C. 3.2.1.74), que existem em poucos sistemas celulolíticos e não interagem sinergisticamente com as outras celulases.

A atividade relativa, quando os grupos de enzimas atuam de maneira isolada, é bastante baixa e quando os três grupos atuam em conjunto, permitem a hidrólise total da celulose (ABRAHÃO, 2001). A Figura 4 mostra a atuação das enzimas multicomponentes da celulase na estrutura da celulose.



**Figura 4:** Atuação das enzimas multicomponentes da celulase na estrutura da celulose. Fonte: Adaptação de ANDREAUS (2001).

## **2.3. FATORES QUE INFLUENCIAM A AÇÃO ENZIMÁTICA EM FIBRAS CELULÓSICAS**

A seguir serão apresentados os estudos já realizados em processos têxteis aplicando enzimas de diferentes origem e natureza agrupadas conforme o principal objetivo estudado no trabalho.

### **2.3.1. Sinergismo entre Enzimas**

Para promover uma boa hidrofiliabilidade do algodão, remoção das sujidades e impurezas naturais, usualmente utilizam-se processos alcalinos ou enzimas em diferentes etapas do processo. A combinação enzimática promove processos mais econômicos e ecológicos, visto que geralmente são feitos em uma única etapa e o sinergismo existente entre enzimas proporciona um maior rendimento para o processo. Segundo estudos realizados por Oner e Sahinbaskan (2011), o pré-tratamento com a combinação das enzimas amilase, pectinase e catalase em tecidos de malha 100% algodão, com posterior tingimento com corantes reativos em um único banho, proporcionou economia de água (a quantidade de água utilizada no processo enzimático foi 69% menor em relação ao processo convencional), redução do tempo de processo (em 170 min em relação ao processo convencional) e menor consumo de energia e redução da geração de efluentes. A redução na quantidade de água é um fator chave para o desenvolvimento sustentável nas indústrias e estratégias diferentes para reduzir a quantidade de água nos processos estão disponíveis nas recentes literaturas (DOVI *et al.*, 2009; JIANG *et al.*, 2010; XIE *et al.*, 2011).

Karapinar e Sariisil (2004) estudaram o efeito da variação do pré-tratamento, combinação enzimática (celulase, pectinase e protease) e tempo de tratamento em tecidos 100% algodão, para determinar as condições ótimas capazes de conferir melhor propriedade de alveamento e tingimento. Devido à diferença nas condições operacionais entre as enzimas, as combinações que incluíram celulases foram realizadas em dois diferentes banhos. Em muitos casos, 30 min de tratamento foi insuficiente para realizar a purga efetiva, quando comparado com 60 e 90 min gastos nos processos convencionais, apesar que acima destes tempos os resultados foram estatisticamente os mesmos. Em alguns casos, a purga alcalina convencional gerou melhores resultados que a enzimática; no entanto, o resultado mais próximo à purga alcalina, pela média de umectabilidade e remoção de

pectina, foi encontrado nas combinações: celulase e pectinase; celulase, protease e pectinase.

### **2.3.2. Efeito de Agentes Químicos na Atividade Enzimática – Inibição ou Ativação**

O uso de agentes químicos como surfactantes e sequestrantes são fundamentais no processo de preparação da indústria têxtil. Os surfactantes conferem umectabilidade, conduzindo o substrato ao contato íntimo com as enzimas e permitindo às enzimas alcançarem regiões inacessíveis sem a presença dos mesmos. Os sequestrantes são importantes pela sua capacidade de sequestrar íons presentes nas fibras que devem ser eliminados. A ausência de sequestrantes pode acarretar em precipitados na superfície do tecido, causados pela combinação dos íons cálcio e magnésio com outros produtos do banho. Esses inconvenientes causarão problemas nos processos de tingimento, estamparia e acabamento (LIN e HSIEH, 2001).

Fernandez-Lafuente (2009) estudou a estabilidade das enzimas como um dos principais problemas que dificultam sua aplicação em escala industrial. Em seu trabalho, diferentes estratégias para estabilizar enzimas foram estudadas. Em primeiro lugar, a utilização de condições experimentais adequadas pode facilitar o tratamento das enzimas (íons, polímeros, etc.). Em segundo lugar, ferramentas genéticas podem ser usadas para reticulação (através de pontes de dissulfeto) ou apenas para reforçar as interações subunidade-subunidade. Concluindo que, a estabilização das enzimas pode ser alcançada em quase todos os níveis da preparação do biocatalisador, permitindo assim o uso em processos industriais com os agentes químicos necessários, conforme observado no trabalho de Freitas (2009).

Kim *et al.* (2009) estudaram a influência do ácido etilenodiamino-tetra-acético (EDTA) na atividade de uma celulase originária de *Bacillus subtilis*, e verificaram que a atividade foi aumentada na presença de alguns íons metálicos em forma de EDTA,  $K^+$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  e  $Mn^{2+}$ , mas inibida por  $Co^{2+}$  e  $Hg^{2+}$ .

Champagne *et al.* (2010) investigaram o efeito de um tensoativo não-iônico, de nome comercial Merspol, na descoloração enzimática com lacase do corante Reativo Azul 19, assim como a influência do mesmo na atividade da enzima lacase. Os resultados mostraram que o surfactante teve pouco efeito na atividade enzimática, no entanto, a descoloração foi inibida com o aumento da concentração do tensoativo.

Csiszar *et al.* (2001) estudaram a adição de ácido etilenodiamino-tetra-acético (EDTA) durante o tratamento de tecidos e impurezas de algodão com as enzimas celulase, pectinase e xilanase e observaram que este agente quelante acelera a ação das enzimas.

Shafiei *et al.* (2010) estudaram o comportamento de uma  $\alpha$ -amilase em ampla faixa de concentrações salinas (0-4 M) NaCl, KCl e agentes inibidores e ativadores. Verificaram que a atividade era máxima em 0,5 M de NaCl ou 1 M KCl e ficou estável em concentrações salinas entre 1 M e 4 M. Os íons  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Al}^{3+}$  inibiram fortemente a enzima, enquanto que  $\text{Ca}^{2+}$  estimula a atividade da amilase. A amilase foi inibida por EDTA, mas não foi inibida pelo fluoreto de fenilmetil-sulfonil (PMSF) e b-mercaptoetanol. A enzima apresentou boa estabilidade para 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS) e sarcosyl, e 2% de Triton X-100, Tween 80 e Tween 20. González *et al.* (2008) também verificaram que a adição do Tween 80 favoreceu a atividade da amilase nas concentrações entre 0,2 – 1%.

### 2.3.3. Influência do pH e Temperatura

Todas as enzimas são afetadas pelo pH do meio. São essencialmente ativas em uma pequena faixa de pH, com um pH ótimo correspondente à atividade máxima. O efeito do pH na catálise enzimática é devido à variação da concentração em  $\text{H}^+$  e conseqüentemente aos diferentes estados de ionização da enzima, do substrato e do complexo enzima-substrato. Uma enzima pode existir em diferentes estados de ionização, uma vez que sendo uma proteína é um composto que tem vários grupos ionizáveis. O impacto na atividade tem a ver com a proximidade entre os grupos ionizados e o centro ativo da enzima. Assim, o efeito do pH na velocidade das reações enzimáticas pode ser devido às alterações da estabilidade da enzima, da afinidade da enzima com o substrato e da transformação catalítica em si. Estes três fatores podem atuar de um modo isolado ou combinado (RICARDO e TEIXEIRA, 1976).

O efeito da temperatura sobre a atividade catalítica pode ser devido a vários fatores, tais como a alteração da estabilidade da enzima, da velocidade de transformação do complexo enzima-substrato e da afinidade entre substrato e enzima (RICARDO e TEIXEIRA, 1976).

Murashima *et al.* (2002) purificaram e caracterizaram endoglucanases de *Rhizopus oryzae*, cujas enzimas foram nomeadas RCE1 e RCE2, com massas moleculares de 41 kDa e 61 kDa, respectivamente. RCE1 e RCE2 hidrolisaram carboximetilcelulose

(CMC), celooligosacarídeo insolúvel (G33), celohexaose e celopenpase, mas não avicel, xilana, galactano, arabinana manana, ou laminarina. A atividade CMCase de ambas as enzimas foi inibida por  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$ . O pH ótimo para a atividade CMCase de ambas as enzimas foi considerado o valor de pH entre 5,0 e 6,0, e temperatura ótima de 55°C.

Agrawal *et al.* (2008) estudaram o desenvolvimento de um novo processo de pré-tratamento de algodão por aplicação de ação mecânica e do tratamento enzimático com eficiência em remover a cutícula e compostos da parede primária das fibras de algodão. O efeito da ação mecânica foi avaliado por um rápido processo de lavagem com cutinase em condições de incubação ideal determinadas, tais como pH 8-9, temperatura 25-30°C, concentração de enzima (100 U) e tempo de incubação 15-30 min. Foi demonstrado que cutinase do fungo *Fusarium solani pisi* é efetiva na degradação das ceras do algodão em baixa temperatura e em menos de 30 min após a aplicação de ação mecânica. Verificou-se também que a remoção da cera com cutinase reduz o tempo de incubação e aumenta a taxa hidrolítica da pectinase. Em escala laboratorial foi realizada uma biopreparação em baixa temperatura utilizando cutinase-pectinase, juntamente com o sequestrante Triton X-100 e ação mecânica por meio de aparelhos de cunha. Com os resultados obtidos foi possível reduzir a temperatura normal de lavagem de 100°C, no processo alcalino com NaOH, para 50°C, utilizando-se pectinase. Resultados ainda melhores foram alcançados com a mistura cutinase-pectinase, onde a temperatura do processo foi 30°C. A remoção de toda a camada externa da fibra é importante para alcançar a hidrofiliabilidade necessária.

Gouveia *et al.* (2008) realizaram um estudo com o objetivo de encontrar as condições ótimas de trabalho para uma combinação de celulase-pectinase. Um planejamento fatorial composto central foi utilizado para estudar os efeitos do pH, temperatura, concentração da enzima e concentração de agente umectante, nas duas respostas selecionadas, ou seja, açúcares solúveis redutores (RS) e solubilidade do alcalóide (AS) de lã para detectar a degradação de plantas e avaliar a qualidade da lã, respectivamente. Os resultados demonstraram que a concentração da enzima apresentou o efeito mais significativo na degradação de resíduos vegetais. Foi liberada uma quantidade equivalente de 240.127 mg de glicose por 1,0 g de resíduo vegetal, em condições ótimas, 40°C, pH 4,0 e 1 mL/L de agente umectante.

O processo de biopreparação utilizando a enzima pectinase (*Bacillus subtilis*) foi estudado por Ahlawat *et al.* (2009) com o objetivo

de obter as melhores condições do tecido purgado com a menor perda de peso, melhor hidrofiliabilidade e grau de alvura, para isto foi utilizado um tecido 100% algodão ( $122 \text{ g/m}^2$ ) e analisado os parâmetros pH, concentração enzimática, temperatura, tempo de incubação e adição de EDTA. O pH do banho variou de 7,0-10,0. A concentração da enzima variou de 5-7,5 U/g de tecido em diferentes temperaturas de incubação que variam de 50 até  $70^\circ\text{C}$  para 30, 60, 90 e 120 min. A biopreparação com pectinase resultou em grande melhoria das propriedades físicas dos tecidos como aumento de 1,2% no grau de branco e hidrofiliabilidade instantânea em relação ao processo alcalino convencional, utilizando as seguintes condições de processo, 5 U/g de pectinase para 120 min de tratamento em pH 9,5 e  $65^\circ\text{C}$ . A adição do EDTA provocou maior perda de peso em relação ao uso isolado da enzima ou mesmo do EDTA sozinho.

#### **2.3.4. Tempo de Processo**

O uso de enzimas em escala industrial requer processos com alta eficiência, baixo custo e tempos curtos. Dentro deste contexto Lenting *et al.* (2002) investigaram como e sob quais condições o tempo de incubação de uma pectinase influenciaria o tempo de processo, e ainda avaliaram a eficiência e rapidez da remoção enzimática dos compostos da cutícula. Notaram que níveis eficientes de degradação de pectina foram obtidos na presença de concentrações de surfactantes relativamente altas. Tempo de incubação enzimática relativamente longo, 30 a 60 min, como frequentemente descritos na literatura, não são necessários, entretanto, tempo de incubação enzimática curto não remove toda a pectina.

#### **2.3.5. Presença de Corantes**

Os tecidos tintos de algodão podem ser hidrolisados por celulasas, porém com maior dificuldade que nos tecidos de algodão bruto, devido ao efeito inibitório da presença de alguns corantes adsorvidos ou reagidos com as fibras do algodão. Como os corantes formam ligações covalentes com os grupos funcionais da celulose nas regiões amorfas, modificando quimicamente a celulose, alguns trabalhos foram desenvolvidos para avaliar essa inibição com diferentes classes de corantes.

Gusakov *et al.* (2001) estudaram a adsorção de celulasas em partículas de corantes índigo e celulose. Observaram que muito mais

proteínas estavam ligadas ao corante do que a celulose nas mesmas condições. No entanto, em geral, a adsorção da enzima em índigo foi menos específico do que a adsorção em celulose. Estes dados confirmam resultados de outros trabalhos de que certas celulasas podem remover índigo do tecido jeans de forma mais eficiente do que outras celulasas com menor superfície hidrofóbica.

Oner e Sahinbaskan (2011) estudaram o comportamento tintorial dos corantes reativos amarelo 15, vermelho 21 e azul 19, onde o substrato foi tingido em um único banho, sendo realizado primeiramente o pré-tratamento enzimático com as enzimas amilase e pectinase, com posterior branqueio com peróxido de hidrogênio e sua neutralização com a enzima catalase, seguido então do tingimento sem descarte do banho. Seus estudos concluíram que os tecidos tingidos mostraram boa uniformidade da coloração, boa lavagem e bons resultados de solidez à fricção a úmido e a seco quando comparados ao processo convencional. Os tecidos apresentaram melhor resistência à tração em relação aos tecidos tingidos convencionalmente, por causa do processo mais curto e as condições mais brandas do processo. No entanto, segundo os autores, para minimizar as diferenças de cor entre o processo enzimático e convencional, uma investigação adicional é necessária para um melhor entendimento das interações enzima/corante.

### **2.3.6. Considerações Finais**

Através do levantamento de trabalhos relevantes da aplicação de enzimas em processos industriais, especificamente têxteis, pôde-se verificar uma lacuna no estudo da ação combinada e simultânea entre as enzimas pectinase-amilase-celulase e a ausência de trabalhos que avaliam a ação do biopolimento ocorrendo simultaneamente ao tingimento. O que se observa são trabalhos de biopolimento com celulasas após o tecido já tingido, ou a ação de enzimas em uma mesma etapa do processo, porém em diferentes tempos de atuação. A relevância dos objetivos do presente trabalho pode ser identificada nos desafios de contribuir na determinação da viabilidade técnica e econômica da utilização de enzimas durante processo produtivo; na determinação das melhores condições operacionais do processo de biopreparação e biopolimento utilizando o *pool enzimático* que contém celulase, pectinase e amilase.

## **CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS**

Neste capítulo será apresentada a descrição dos procedimentos experimentais utilizados nos processos de biopreparação, preparação convencional e tingimento, incluindo os reagentes e equipamentos utilizados. Estes experimentos foram realizados no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, no Laboratório de Transferência de Massa (LABMASSA) e no Laboratório Químico de uma empresa Têxtil da região do Vale do Itajaí.

### **3.1. MATERIAIS**

#### **3.1.1. Substrato Têxtil**

Foram utilizados tecidos felpudos de algodão (500 g/m<sup>2</sup>), título fio 14/1 cardado (urdume I), 12/1 penteado (urdume II) e 14/1 cardado na trama. As amostras de tecidos utilizados como corpos de prova nos ensaios foram provenientes de um único lote, garantindo a padronização dos corpos de prova, quanto ao tipo de fio, gramatura, cor e hidrofiliidade.

#### **3.1.2. Enzimas**

Foi utilizada uma pectinase alcalina, classificada como pectato liase (E.C. 4.2.2.2) de nome comercial Biokey BSPG, uma  $\alpha$ -amilase (E.C. 3.2.1.1) de nome comercial Biokey DSK e uma celulase multicomponente, classificada como celobiohidrolase, endoglucanase e celobiose (E.C. 3.2.1.91, E.C. 3.2.1.4 e E.C. 3.2.1.21) de nome comercial Quimilase Neu, produzidas pela Novozymes. A Tabela 2 apresenta as características das enzimas utilizadas no trabalho. O tempo de reação enzimática recomendado pelo fabricante é de 30 a 60 min.

**Tabela 2:** Características das enzimas utilizadas no trabalho.

<b>Enzima</b>	<b>Pectinase</b>	<b>Amilase</b>	<b>Celulase</b>
Origem/Fonte	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
pH ótimo	6,5-8,5	5,0-7,0	5,5-7,0
Temperatura ótima (°C)	55-75°C	50-110°C	50-65°C

Fonte: Novozymes.

### 3.1.3. Corantes

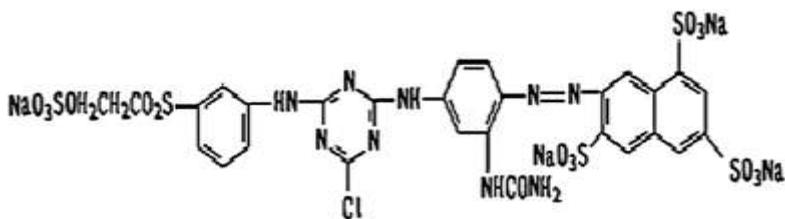
Os corantes utilizados para o desenvolvimento do trabalho foram os azo corantes Amarelo Reativo 145, Vermelho Reativo 194 e o corante bifuncional Azul Reativo 221. Os corantes foram utilizados no estado sólido, e escolhidos com o objetivo de estudar o processo de tingimento e biopolimento simultâneos.

As principais propriedades destes corantes são apresentadas na Tabela 3.

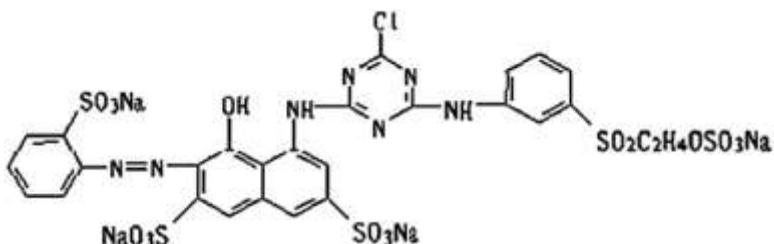
**Tabela 3:** Propriedades dos corantes utilizados.

<b>Corantes</b>	<b>Classe</b>	<b>Massa Molecular</b>	<b>Comprimento de onda</b>
Amarelo 145	Reativo	1026,2 g/mol	419 nm
Vermelho 194	Reativo	984,2 g/mol	522 nm
Azul 221	Reativo	315,0 g/mol	615 nm

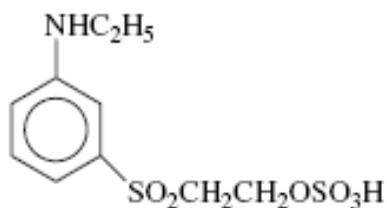
A Figura 5 mostra a estrutura molecular dos corantes estudados.



(a)



(b)



(c)

**Figura 5:** Estrutura dos corantes reativos: (a) Amarelo 145, (b) Vermelho 194, (c) Azul 221.

### 3.1.4. Reagentes

Os principais reagentes utilizados nos processos de biopreparação, preparação convencional e tingimento foram ácido acético, ácido clorídrico, ácido 3,5 dinitrosalisílico (DNS), álcool etílico, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio, carboximetilcelulose, corante Comassie Brilliant Blue G-250, fenol, fosfato de sódio dibásico, fosfato de sódio monobásico,

metabissulfito de sódio, albumina de soro bovino (BSA), tartarato duplo de sódio e potássio, pectina cítrica, Tris(hidroximetil)aminometano, cloreto de cálcio anidro, cloreto de sódio, azul de metileno, amido solúvel, acrilamida/Bis-Acrilamida, TEMED e APS. Os reagentes utilizados foram de grau analítico P.A. e usados sem prévios tratamentos.

### **3.1.5. Equipamentos**

Foram utilizados pHmetro modelo MP120, marca Micronal; para pesar os reagentes, a balança analítica modelo BG200, marca Gehaka; para os ensaios de biopreparação e tingimento, o aparelho de laboratório para tingimento até 135°C HT-wash-teste, marca Mathis; para os testes de solidez da cor à luz, o aparelho Suntest CPS software versão 1.2; para os testes de solidez da cor à fricção, o aparelho crockmeter; para as dosagens de atividade enzimática foi utilizado o banho termostatizado modelo 1063, marca Biomatic; para a determinação de perda de massa, a estufa de circulação de ar MA 035, marca Marconi; para determinação do grau de alvura o espectrofotômetro de remissão com lâmpada padrão, modelo CM-3600d, marca Minolta; para testes em escala piloto, máquina cotton flow modelo T858, marca Thies.

## **3.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

### **3.2.1. Caracterização das Preparações Enzimáticas**

#### **3.2.1.1. Determinação da Quantidade de Proteínas**

A quantidade de proteínas presente nas amostras das preparações enzimáticas utilizadas foram dosadas pelo método de Bradford (1976), baseado na ligação do corante Comassie Brilliant Blue G-250 à proteína. A albumina de soro bovino (BSA) foi usada como padrão para preparar a curva de calibração nas concentrações de 0 a 1 mg/mL.

Para determinar a concentração de proteínas presente nas amostras, misturam-se 5 mL do reagente Comassie com 0,1 mL de amostra e lê-se a absorbância a 595 nm, contra um branco de reagente Comassie Blue com o tampão de preparado da amostra. Para o preparo do reagente Comassie dissolve-se 100 mg de Comassie Brilliant Blue G 250 em 50 mL de etanol 95%, depois adicionou-se 100 mL de ácido

fosfórico concentrado com posterior diluição até 1.000 mL com água destilada.

### 3.2.1.2. Determinação de Açúcares Redutores

A curva padrão para determinação da concentração de açúcares redutores foi construída com solução de glicose, nas concentrações de 0,5 a 2  $\mu\text{mol/mL}$  para a celulase, 0,2 a 1  $\mu\text{mol/mL}$  para a pectinase e 0,5 a 5  $\mu\text{mol/mL}$  para a amilase.

Em todas as curvas foram realizadas a adição sequencial de solução tampão, solução estoque de glicose e solução de DNS. Os tubos foram agitados, aquecidos durante 5 min a 100°C e resfriados em banho de gelo. Após o resfriamento das soluções foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm.

### 3.2.1.3. Determinação da Atividade da Pectinase

A atividade da pectinase foi determinada medindo-se o aumento de açúcares redutores liberados no ácido poligalacturônico (Miller, 1959). Uma solução de enzima de 100  $\mu\text{L}$  foi incubada em tubo de ensaio a 55°C na presença de 900  $\mu\text{L}$  de 0,25% (p/v) de pectina cítrica, 20 mmol de NaCl e 0,1 mmol de  $\text{CaCl}_2$  em tampão Tris-HCl 0,05 mol pH 8,5 durante 5 min segundo método de Collmer (1986). Após este tempo adicionou-se 1 mL de DNS e a solução foi fervida por 10 min e resfriada em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  e a absorbância foi lida em 540 nm. Foram feitas amostras de branco sem a adição da enzima.

Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por minuto. A atividade pectinolítica foi determinada pela Equação (1), expressa em U/mL ou  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ .

$$A = \frac{[C] \times V_T \times D_E}{t \times V_E} \quad (1)$$

Onde:

$[C]$  = concentração de açúcar redutor ( $\mu\text{mol/mL}$ );

$V_T$  = volume total da solução (mL);

$D_E$  = diluição da solução enzimática;

$t$  = tempo de reação (minutos);

$V_E$  = volume da solução de enzima (mL).

### 3.2.1.4. Determinação da Atividade da Amilase

A atividade da  $\alpha$ -amilase foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados durante a hidrólise do amido (Bernfeld, 1955). Uma solução de enzima de 25  $\mu$ L foi incubada em tubo de ensaio a 45°C na presença de 475  $\mu$ L de 1% (p/v) de amido, 0,5 M de NaCl em tampão Tris-HCl 20 mM com pH 7,5 durante 15 min. Após este tempo adicionou-se 0,5mL de DNS e a solução foi fervida por 5 min e resfriada em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se 2 mL de H<sub>2</sub>O e a absorbância foi lida em 540 nm. Foram feitas amostras de branco sem a adição da enzima. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto. A atividade aminolítica foi determinada pela Equação (1), expressa em U/mL ou  $\mu$ mol/mL.min.

### 3.2.1.5. Determinação da Atividade da Celulase

A degradação do polímero de celulose pode ser realizada pela ação de uma das enzimas multicomponentes (EG, CBH e  $\beta$ G) que atuam sinergicamente. A determinação da atividade enzimática da enzima celulase foi realizada para a atividade celulolítica EG pela quantificação dos açúcares redutores segundo Miller (1959). Para eliminar os interferentes gerados durante a reação com o substrato, foram realizadas simultaneamente provas em branco.

A atividade celulolítica da endo  $\beta$ -(1,4)-glucanase ou carboximetilcelulase (CMCase) foi determinada utilizando solução de carboximetilcelulose 4% (massa/volume), como substrato, em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5, segundo o método de Ghose (1987). A mistura da reação foi composta de 900  $\mu$ L da solução de substrato e 100  $\mu$ L de enzima. Incubou-se a mistura, sob agitação de 40 rpm, a 50 $\pm$ 1°C, durante 30 min. Após o tempo de incubação, adicionou-se 1,5 mL do reagente DNS e submeteu-se a temperatura de ebulição durante 5 min, em seguida resfriou-se em banho de gelo. Após homogeneização foi

realizada a leitura de absorbância no comprimento de onda 540 nm, usando glicose como padrão. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar a liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por minuto. A atividade celulolítica foi determinada pela Equação (1), expressa em U/mL ou  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ .

### 3.2.1.6. Caracterização Enzimática em Gel de Eletroforese (SDS-PAGE)

A eletroforese foi realizada segundo o método descrito por Laemmli (1970). As amostras analisadas foram preparadas a fim de obter-se uma concentração final de 50 mg de proteína para cada 1 ml de amostra, para tal as mesmas foram diluídas com a solução tampão de amostra. Posteriormente à adição do tampão de amostra procedeu-se com a desnaturação a 95°C por 5 min.

A massa molecular foi determinada pela eletroforese desnaturante SDS-PAGE, usando o gel de corrida a 12,5% e o gel de concentração 5% apresentados na Tabela 4, confeccionando géis de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS). O padrão de massa molecular usado como marcador foi 6,5 a 200 kDa (SDS-PAGE) e as bandas foram evidenciadas com coomassie blue.

**Tabela 4:** Reagentes para a preparação do gel de Poliacrilamida.

Gel de Poliacrilamida*	Concentração	
	5%	12,5%
Acrilamida/Bis-Acrilamida (30% T, 3% C)	1660	10500
Solução Tampão Tris HCl 1 M, pH 6,8	2500	-
Solução Tampão Tris HCl 1,5 M, pH 8,8	-	6250
SDS 10%	2000	2500
Água Deionizada Bidestilada ou MiliQ	3720	5750
TEMED	20	25
APS 10%	100	125
VOLUME TOTAL (L)	10000	25150

\* Produz um gel de (20 x 20)  $\text{cm}^2$ .

Para determinação da massa molecular das proteínas procedeu-se com a construção do gráfico  $\log MM$  versus mobilidade (Rf) do padrão da massa molecular.

### **3.2.2. Tratamentos dos Tecidos Felpudos de Algodão**

Os corpos de prova (amostras de felpudo de fio penteado 100% algodão) sem tratamento e tratadas, com biopreparação e alvejamento convencional, foram caracterizadas quanto à hidrofiliabilidade, grau de alvura, perda de massa, remoção de pectina e residual de amido. Posteriormente, determinou-se a influência de um agente umectante e sequestrante na etapa de biopreparação. O agente umectante foi adicionado no início do processo, e o sequestrante adicionado em duas etapas, no início do processo e após o tempo de reação enzimática determinado no item 3.3.2.

Sobre o processo que se mostrar mais eficaz serão realizados ensaios de tingimento e biopolimento simultâneos, nesta etapa será avaliado o rendimento tintorial, formação de *pillig* e a formação de pó nos tecidos, posteriormente serão testados em máquinas piloto de produção e avaliado a solidez da cor (fricção seco e úmido), solidez à luz, solidez à lavagem e hidrofiliabilidade final.

#### **3.2.2.1. Hidrofiliabilidade**

Foi utilizado o método de visualização rápida, adaptado da norma NBR 13.000 (ABNT/NBR 13000). O método consistiu, inicialmente, na fixação do tecido em um bastidor de bordado, procedeu-se o gotejamento de uma gota de água destilada ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ), a 40 mm da superfície do tecido. O acionamento do cronômetro foi realizado no momento em que a gota tocou o tecido e parou quando a água sobre a superfície do tecido foi completamente absorvida. O resultado foi a média de 5 ensaios consecutivos, tanto nas laterais como no centro do tecido.

#### **3.2.2.2. Grau de Alvura**

O grau de alvura foi determinado nos corpos de prova submetidos ao processo de biopreparação e preparação convencional, usando um espectrofotômetro de re-emissão com lâmpada padrão, modelo CM-3600d, marca Minolta, usando cerâmica branca como padrão de calibração.

### 3.2.2.3. Perda de Massa

A perda de massa foi calculada através das massas dos corpos de prova antes e depois dos tratamentos, com purga enzimática ou alcalina, após secagem em estufa de ventilação de ar a 105°C, durante 4 horas e resfriamento em dessecador. A Equação (2) foi utilizada para o cálculo da perda de massa percentual (ALY *et al.*, 2004):

$$\text{Perda de Massa} = \left[ \frac{(m1 - m2)}{m1} \right] * 100 \quad (2)$$

Onde:

$m1$  = massa do corpo de prova antes do tratamento (g);

$m2$  = massa do corpo de prova após o tratamento (g).

### 3.2.2.4. Determinação de Pectina Removida

O residual de pectina no tecido foi analisado pelo método do tingimento com azul de metileno. As amostras de 10 g foram tingidas com 0,6 mmol/L de azul de metileno, em uma relação de banho de 1:50 durante 100 min em um banho agitado a 70°C. Foi realizada a determinação da absorbância da solução corante antes e depois do tingimento em espectrofotômetro a 663 nm. Uma curva de calibração foi feita com as concentrações de corante variando entre 0,2–0,6 mmol/L. Este método baseia-se na interação estequiométrica entre o cátion do corante e o ânion do carboxilato da pectina. Quanto maior a quantidade de azul de metileno absorvido nas fibras, maior será o conteúdo de pectina, e portanto um azul mais escuro será obtido após o tingimento. Os tingimentos foram realizados com o tecido cru (considerado com 100% de pectina), com o tecido alvejado (considerado com 0% de pectina) e com as amostras purgadas enzimaticamente conforme descrito por Wang *et al.* (1998).

### 3.2.2.5. Determinação do Residual de Amido

Para a determinação do residual de gomas no tecido, o teste mais frequente e eficiente é a adição de uma solução de  $I_2/I^-$  sobre uma

amostra do tecido. A formação de uma mancha azul/negro é indicativa da presença do amido, enquanto uma coloração amarelo-pálida indica que o amido foi eficientemente hidrolisado. Para verificação da quantidade de amido residual utilizou-se a escala de iodo Tegewa, que é associada a uma escala de cores com valores de amido situados entre 2,5 e 0,10% de acordo com a Tabela 5. Considerando-se que esta reação é instável, e assim, não foi possível conservar as amostras de tecidos. A escala foi feita com base em fotos, que se aproximam dos efeitos reais obtidos no teste, conforme mostra a Figura 6, a escala varia da nota 1 até a nota 9, sendo 9 a melhor nota e 1 a pior.

**Tabela 5:** Valores de amido avaliados pela escala Tegewa.

<b>Tegewa</b>	<b>% amido</b>
9	< 0,10 %
8	0,10 - 0,14 %
7	0,14 - 0,20 %
6	0,20 - 0,30 %
5	0,30 - 0,50 %
4	0,50 - 0,90 %
3	0,90 - 1,50 %
2	1,50 - 2,50%
1	> 2,50 %

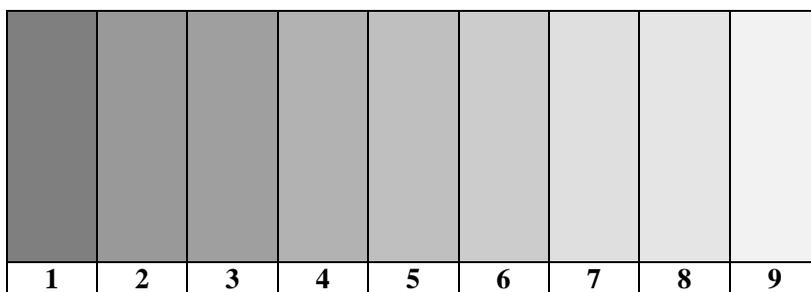


Figura 6: Escala Tegewa utilizada para avaliação do grau de desengomagem.  
Fonte: Manual da Merck.

### 3.2.2.6. Caracterização do Comportamento Tintorial

A quantificação da cor foi realizada através do método CIELab, que fornece valores numéricos do espaço de cor  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $H^*$  e

suas respectivas diferenças em deltas:  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$ ,  $\Delta b^*$ ,  $\Delta C^*$ ,  $\Delta H^*$  e  $\Delta E^*$  (Berns, 2000).

O método localiza a cor em um espaço tridimensional, utilizando como coordenadas:  $L^*$  (luminância) – que pode variar de 0 (preto) a 100 (branco);  $a^*$  (que assume valores negativos (verde) ou positivos (vermelho)); e  $b^*$  (com valores negativos (azul) e positivos (amarelo)), sendo que os planos  $a^*b^*$  podem ocorrer em qualquer nível de  $L^*$ . Por meio destas três coordenadas, pode-se posicionar uma cor no espaço, e ao obter-se os valores do padrão e da amostra, é possível calcular as diferenças entre eles em cada coordenada, e também a diferença total ( $\Delta E$ ). As coordenadas  $C$  e  $H$  são definidas como:  $C$  é a saturação, que é a distância radial do centro do espaço até o ponto da cor, e  $H$  é o ângulo total dentro do espaço  $L^*C^*H^*$ .

As amostras obtidas foram analisadas através de leituras comparativas em espectrofotômetro Datacolor, onde os resultados foram fornecidos em valores de força colorística (%) e diferença de cor  $\Delta E$  (cmc). Os valores de força colorística obtidos representam o rendimento tintorial e são comparáveis a um padrão de referência estabelecido.

A análise é realizada pela comparação entre amostras de um mesmo teste, na situação do tingimento e biopolimento simultâneos e biopolimento antes do processo de tingimento, obtendo um percentual que representa o corante fixado em relação ao corante esgotado, ou pela comparação entre amostras de testes diferentes (sobre o tecido alvejado e tecido biopreparado) a fim de identificar qual dos testes atingiu maior rendimento de cor.

Já os valores de  $\Delta E$  (cmc) indicam o desvio residual da cor entre amostras. Conforme BERGER-SHUNN (1994) este valor é obtido através de equações matemáticas as quais consideram a variação da luminosidade ( $L$ ), da saturação ( $C$ ) e da tonalidade da cor ( $H$ ). O limite de tolerância adotado neste trabalho é de  $\Delta E \leq 1,0$ , industrialmente o nível comumente aceito no ramo têxtil é de no máximo 1,2. Entretanto, este valor é um critério estabelecido por cada fabricante ou cliente. Não há uma regulamentação oficial.

Os tingimentos foram realizados em triplicata.

### 3.2.2.7. Pilling e Pilosidade

Para a realização dos testes de *pillling* e pilosidade foi utilizado o método interno da empresa onde se realizou o trabalho. O teste de pilosidade consistiu em costurar as laterais de duas toalhas e pesá-las (aproximadamente 2 kg). As toalhas foram lavadas em máquina de lavar

para reproduzir uma lavagem caseira, utilizando nível médio e enxágue simples, secas em secadora industrial a tambor por 1 hora, a 60°C. Após a secagem retirou-se da máquina as toalhas e o pó (fibras soltas) que ficou retido na gaveta da máquina. Deixou-se o pó e as toalhas climatizando por 15 minutos, após a climatização o pó foi pesado para o cálculo do resultado de percentual de pó conforme Equação (3):

$$Pó = \frac{\text{Peso do Pó}}{\text{Peso da Toalha}} \quad (3)$$

A avaliação do *pillling* é feita na toalha, comparando-se a superfície da toalha com padrões fotográficos ASTM-D 3512 conforme mostra a Figura 7. As notas variam de 5 a 1, sendo 5 a melhor nota e 1 a pior.

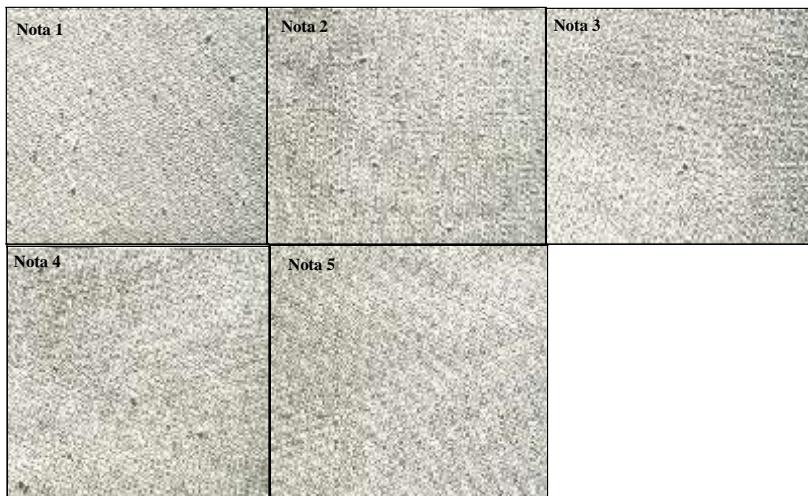
**Figura 7:** Tabela de padrões fotográficos de *pillling*. Fonte: ASTM-D 3512.

### 3.2.2.8. Solidez da Cor à Fricção

Para avaliação da solidez da cor à fricção foi utilizado método segundo NBR ISO 105 – X12 – Textiles – *Tests for colour fastness – Part X12– Colour fastness to rubbing*. O método consistiu em cortar duas amostras do tecido a ser testado no tamanho 14 cm x 5 cm no mesmo sentido (trama ou urdume), sendo uma para a solidez a fricção seco e a outra para a solidez a fricção úmido.

Os testes de solidez foram realizados com a fixação do tecido (úmido ou seco) na base do aparelho, a amostra foi então friccionada executando-se 10 movimentos circulares dentro de 10 segundos.

As amostras foram avaliadas com uma escala de cinza para verificar a solidez e degradação da cor (a escala de cinza varia da nota 5 até a nota 1, sendo 5 a melhor nota e 1 a pior).



**Figura 7:** Tabela de padrões fotográficos de *pilling*. Fonte: ASTM-D 3512.

### 3.2.2.9. Solidez da Cor à Luz

Para avaliação da solidez da cor à luz foi utilizado método segundo NBR 12997. As amostras foram fixadas no suporte do aparelho, e deixadas por um período de 40 horas, posteriormente foram avaliadas usando-se uma escala azul para verificar a degradação da cor (a escala azul varia da nota 8 até a nota 1, sendo 8 a melhor nota e 1 a pior).

### 3.2.2.10. Solidez da Cor à Ação da Lavagem

Para avaliação da solidez da cor à lavagem foi utilizado método segundo NBR ISO 105-C04. As amostras foram submetidas à ação de lavagem em solução com sabão padrão e um tecido padrão para avaliação da migração da cor, à temperatura de 65°C em máquina de tingimento HT. Posteriormente as amostras foram avaliadas com uma escala de cinza para verificar a solidez e degradação da cor (a escala de cinza varia da nota 5 até a nota 1, sendo 5 a melhor nota e 1 a pior).

Quanto aos padrões de notas mínimas exigidas ainda não se tem legislação ou publicação oficial no Brasil. As normas NBR apenas regulamentam o procedimento de teste e a avaliação do resultado de acordo com uma escala padronizada. As empresas, conforme a aplicação

de seu produto, necessidades dos consumidores e critérios de qualidade estabelecem valores dentro destas escalas.

### **3.3. PROPRIEDADES CATALÍTICAS DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS**

As enzimas pectinase, amilase e celulase foram caracterizadas quanto à atividade em função da combinação das concentrações enzimática, efeito de agentes sequestrantes, pH, temperatura e tempo de processo. Estudou-se como estas propriedades alteram o comportamento da catálise e também sua influência na estabilidade enzimática.

#### **3.3.1. Estudo do Pool Enzimático**

Para determinar qual a melhor combinação entre as enzimas pectinase, celulase e amilase na etapa de biopreparação foi realizado um planejamento de misturas apresentado no item 3.4. Os parâmetros pH, temperatura e tempo de reação foram fixados em 6,5, 55°C e 20 min, respectivamente.

#### **3.3.2. Influência da Temperatura, Tempo de Reação e pH na Atividade Enzimática**

Os ensaios foram realizados conforme planejamento fatorial completo 3<sup>3</sup>, apresentado no item 3.4.

A influência da temperatura, tempo de reação e pH sobre a atividade das enzimas estudadas foi avaliada no intervalo de 55 a 75°C, 20 a 60 min e pH 5,5 (solução tampão Fosfato-NaOH, 0,1M), pH 6,5 (solução tampão Tris-HCl, 0,05M) e pH 7,5 (solução tampão Tris-HCl, 0,02M), com o objetivo de encontrar a melhor condição para atender as três enzimas agindo simultaneamente. A combinação enzimática utilizada foi a determinada no item 3.3.1, contendo 66% de pectinase, 17% de amilase e 17% de celulase.

#### **3.3.3. Efeito de Agentes Químicos na Atividade Enzimática**

Foi realizado um estudo de como agentes umectantes e sequestrantes, utilizados na biopreparação e preparação convencional, influenciam na atividade das enzimas pectinase, amilase e celulase. Foram incubados a 65°C e pH 6,5 (conforme determinado no item 3.3.2) 100 mL da solução com as três enzimas, nos respectivos percentuais definidos no planejamento experimental, apresentado no item 3.3.1, com

1 g/L de umectante no início do processo e 0,5 g/L de sequestrante, no início do processo e após o tempo de reação enzimática de 40 min, conforme determinado no item 3.3.2, posteriormente foi realizada a medida de atividade conforme os itens 3.2.1.3, 3.2.1.4, 3.2.1.5.

### 3.4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ESTATÍSTICO

A Tabela 6 apresenta o planejamento experimental de mistura com duas replicações no ponto central, contendo um total de 1 mL/L de enzimas correspondente a 100%. As respostas medidas foram: atividade para pectinase, atividade para amilase e atividade para celulase, usando-se a metodologia específica para cada enzima.

O objetivo deste planejamento é saber se a determinação da atividade de uma certa enzima é influenciada pela presença de outras duas e qual a magnitude desta interferência. O planejamento de mistura como um todo foi replicado 5 vezes.

**Tabela 6:** Planejamento experimental de mistura.

Ensaio	Amilase	Pectinase	Celulase
1	100%	0%	0%
2	0%	100%	0%
3	0%	0%	100%
4	33,33%	66,67%	0%
5	33,33%	0%	66,67%
6	0%	33,33%	66,67%
7	66,67%	33,33%	0%
8	66,67%	0%	33,33%
9	0%	66,67%	33,33%
10	33,33%	33,33%	33,33%
11	66,67%	16,66%	16,66%
12	16,66%	66,67%	16,66%
13	16,66%	16,66%	66,67%
14	33,33%	33,33%	33,33%

\*pH 6,5; T = 55°C; Tempo de reação = 20 min.

Um novo planejamento foi realizado com objetivo de determinar as condições ideais de processo, a fim de se obter a máxima eficiência do *pool enzimático*. Para avaliar a influência dos parâmetros pH, temperatura e tempo de reação utilizados na biopreparação sobre a atividade das enzimas, foram realizados ensaios segundo os níveis apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7:** Níveis dos parâmetros estudados para avaliar a influência do tempo de reação, pH e temperatura sobre a atividade enzimática.

<b>Fator</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
1	Tempo de Reação (min)	20	40	60
2	pH	5,5	6,5	7,5
3	Temperatura (°C)	55	65	75

O planejamento fatorial completo  $3^3$  perfazendo um total de 27 corridas é proposto na Tabela 8. Os valores de tempo de reação, pH e temperatura, nos níveis estudados no planejamento experimental, correspondem aos valores mínimo (-1) e máximo (+1) sugeridos pelo fabricante. O planejamento fatorial foi replicado 3 vezes.

**Tabela 8:** Planejamento experimental  $3^3$  utilizado para avaliar a influência dos parâmetros tempo de reação, pH e temperatura sobre a atividade enzimática.

<b>Ensaio</b>	<b>Fator</b>		
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
	<b>Tempo de Reação (min)</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
1	20 (-1)	5,5 (-1)	5,5 (-1)
2	20 (-1)	5,5 (-1)	6,5 (0)
3	20 (-1)	5,5 (-1)	7,5 (1)
4	20 (-1)	6,5 (0)	5,5 (-1)
5	20 (-1)	6,5 (0)	6,5 (0)
6	20 (-1)	6,5 (0)	7,5 (1)
7	20 (-1)	7,5 (1)	5,5 (-1)
8	20 (-1)	7,5 (1)	6,5 (0)

9	20 (-1)	7,5 (1)	7,5 (1)
10	40 (0)	5,5 (-1)	5,5 (-1)
11	40 (0)	5,5 (-1)	6,5 (0)
12	40 (0)	5,5 (-1)	7,5 (1)
13	40 (0)	6,5 (0)	5,5 (-1)
14	40 (0)	6,5 (0)	6,5 (0)
15	40 (0)	6,5 (0)	7,5 (1)
16	40 (0)	7,5 (1)	5,5 (-1)
17	40 (0)	7,5 (1)	6,5 (0)
18	40 (0)	7,5 (1)	7,5 (1)
19	60 (1)	5,5 (-1)	5,5 (-1)
20	60 (1)	5,5 (-1)	6,5 (0)
21	60 (1)	5,5 (-1)	7,5 (1)
22	60 (1)	6,5 (0)	5,5 (-1)
23	60 (1)	6,5 (0)	6,5 (0)
24	60 (1)	6,5 (0)	7,5 (1)
25	60 (1)	7,5 (1)	5,5 (-1)
26	60 (1)	7,5 (1)	6,5 (0)
27	60 (1)	7,5 (1)	7,5 (1)

---

O estudo das condições ideais do processo na ação combinada faz-se necessário devido à importância destes parâmetros na atividade enzimática, conforme apresentado em algumas referências que constam na revisão bibliográfica.

### 3.5. PROCESSOS UTILIZADOS

A seguir são apresentados os processos de biopreparação, preparação alcalina e tingimento utilizados nos corpos de prova, tecidos felpudos 100% CO, a partir dos resultados obtidos nos planejamentos

experimentais. Os ensaios foram desenvolvidos no aparelho de laboratório para tingimento até 135°C *HT-wash-test*, marca Mathis.

### 3.5.1. Biopreparação

As amostras foram submetidas a dois processos distintos: 1) *all in*, na qual todos os agentes químicos foram adicionados no mesmo banho que as enzimas; 2) aplicação enzimática com adição de sequestrante após o tempo de reação enzimática definido no item 3.3.2. Os experimentos foram realizados com controle (tampão e agentes químicos) para avaliar o comportamento das enzimas na presença do umectante e sequestrante. Os gráficos representativos dos processos 1 e 2 são mostrados na Figura 8.

As quantidades dos produtos utilizados nas etapas do processo enzimático para tecido felpudo 100% CO, com relação de banho (RB) de 1:10, são apresentadas na Tabela 9. Os agentes químicos utilizados na biopreparação foram: sequestrante Quilatan ABT (composição: ácidos fosfônicos) e umectante Quimifen COT (composição: composto sinérgico de tensoativos aniônicos e não iônicos modificados).

Para o processo *all in* (1), todos os produtos foram adicionados simultaneamente no início do processo a 65°C durante 40 min, com posterior enxágue e desnaturação da enzima a 95°C durante 5 min. No processo 2 de biopreparação é utilizado umectante a 65°C durante 40 min, posteriormente ocorre a adição do sequestrante a 65°C durante 10 min, em seguida é feito um enxágue e desnaturação da enzima somente com água, a 95°C durante 5 min. Antes da introdução do substrato aos canecos, os agentes químicos e as enzimas foram misturados, para garantir a homogeneidade das enzimas e consequentemente sua atuação uniforme nas fibras.

**Tabela 9:** Procedimento utilizado na biopreparação de tecido felpudo 100% CO, RB 1:10.

<b>Etapa</b>	<b>Biopreparação <i>all in</i></b>	<b>Etapa</b>	<b>Biopreparação com adição de sequestrante após o tratamento enzimático</b>
1	Umectante (1,0 g/L) Sequestrante (0,5 g/L) Tampão pH 6,5 Celulase (1587 U/mL)	1A	Umectante (1,0 g/L) Tampão 6,5 Celulase (1587 U/mL) Pectinase (4029 U/mL)

	Pectinase (4029 U/mL) Amilase (1496 U/mL) T = 65°C; t = 40 min		Amilase (1496 U/mL) T = 65°C; t = 40 min
2	Lavação: T = 95°C; t = 5 min	1B	Sequestrante (0,5 g/L) T = 65°C; t = 10 min
		2	Lavação: T = 95°C; t = 5 min

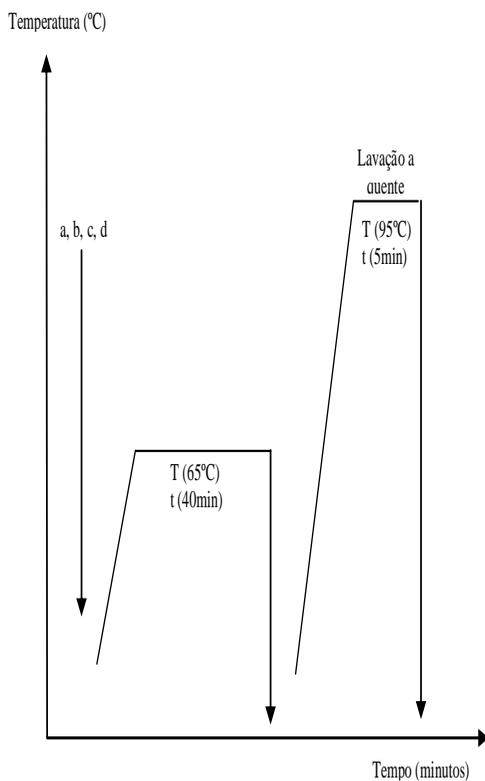


Figura 8 (1): Processo de biopreparação com adição de sequestrante no início do tratamento enzimático (a) tampão pH 6,5; (b) umectante; (c) enzimas; (d) sequestrante.

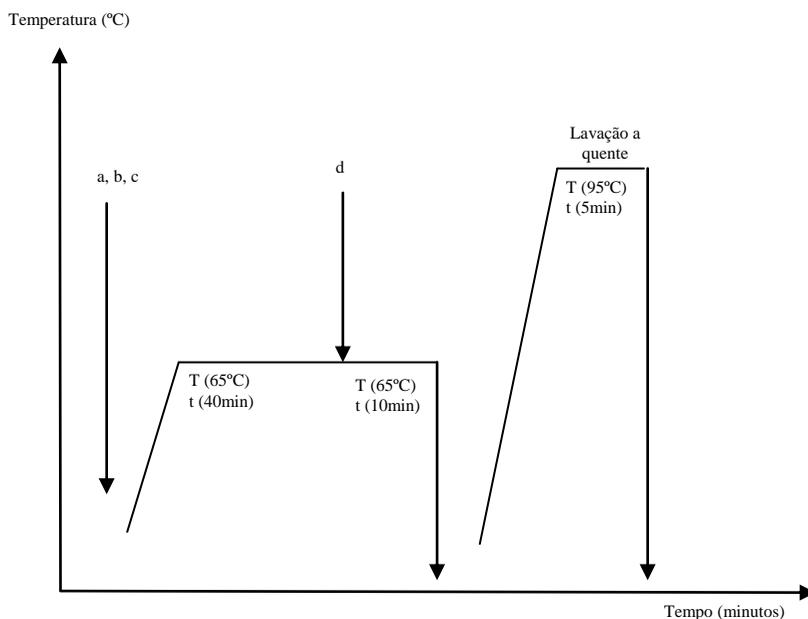


Figura 8 (2): Processo de biopreparação com adição de sequestrante após tratamento enzimático (a) tampão pH 6,5; (b) umectante; (c) enzimas; (d) sequestrante.

### 3.5.2. Preparação Alcalina

O perfil do processo de preparação alcalina, para tecido felpudo 100% CO, com relação de banho (RB) de 1:10 está representado na Figura 9 e as condições utilizadas nos patamares são apresentadas na Tabela 10. A base química do decompositor de peróxido utilizado é tiossulfato de sódio.

**Tabela 10:** Procedimento utilizado para preparação alcalina de tecido felpudo 100% CO, RB 1:10.

Etapa	Produtos e quantidades utilizados na preparação alcalina.
1	Sequestrante (0,5 g/L); Umectante (1 g/L); NaOH 50% (4 mL/L); Peróxido de hidrogênio (1,6%); T = 95°C; t = 25 min
2	Decompositor de peróxido (1,6%); T = 80°C; t = 10 min
3	Lavação: Ácido acético 90% (0,8 g/L); T = 50°C; t = 10 min
4	Lavação: T = 50°C; t = 5 min

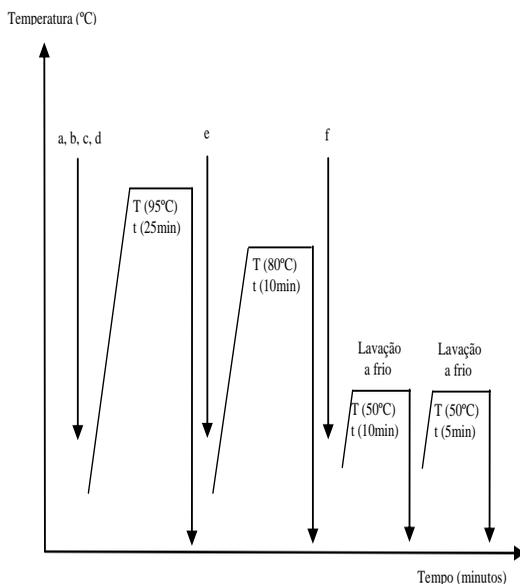


Figura 9: Processo de preparação alcalina (a) NaOH; (b) peróxido de hidrogênio; (c) umectante; (d) sequestrante; (e) decompositor de peróxido; (f) ácido acético.

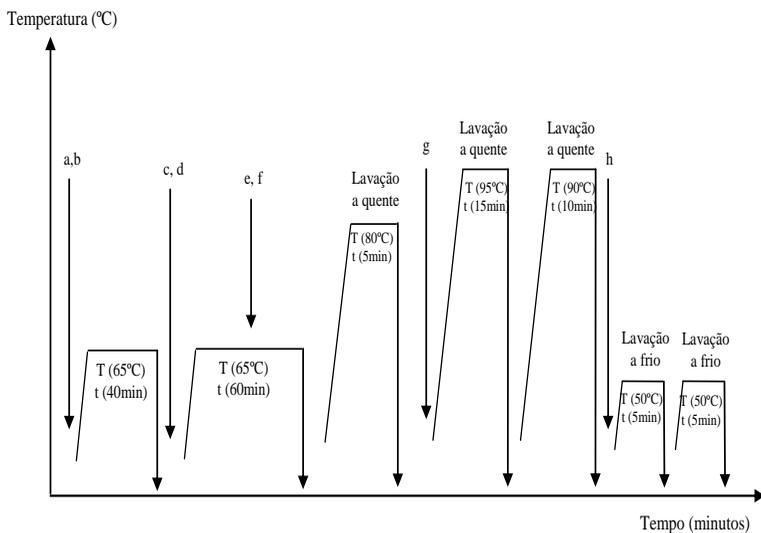
### 3.5.3. Processo de Tingimento e Biopolimento

Os ensaios de tingimento foram realizados sobre o tecido alvejado e biopreparado, e as amostras foram submetidas a dois processos distintos: 1) processo convencional de biopolimento e

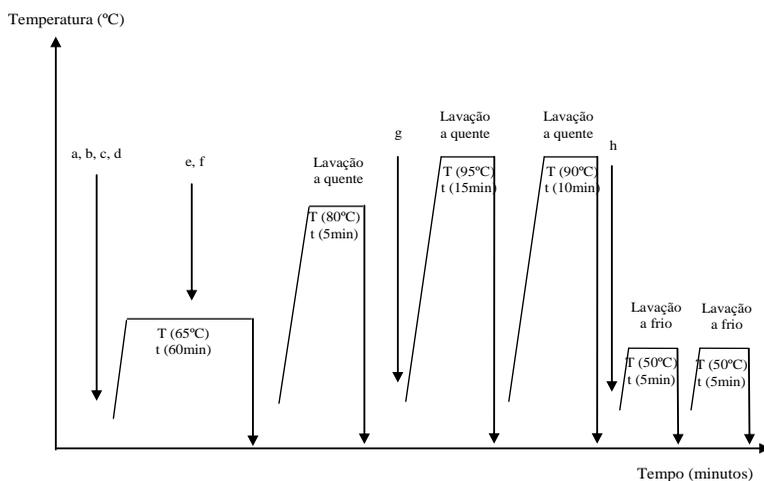
tingimento, sendo realizado primeiramente o biopolimento durante 40 min, e posteriormente a etapa de tingimento por mais 60 min; 2) processo de biopolimento e tingimento simultâneos, no qual o sal, corante e enzima foram adicionados no mesmo banho durante 60 min. O processo de tingimento sem o biopolimento também foi realizado para fins comparativos. As condições utilizadas são apresentadas na Tabela 11, e os gráficos representativos dos processos 1 e 2 são mostrados na Figura 10.

**Tabela 11:** Procedimento utilizado no tingimento e biopolimento convencional e simultâneo de tecido felpudo 100% CO, RB 1:10.

<b>Etapa</b>	<b>Processo Convencional de Biopolimento e Tingimento</b>	<b>Etapa</b>	<b>Processo de Biopolimento e Tingimento Simultâneos</b>
<b>1</b>	Tampão pH 6,5 Celulase (0,50 g/L) T = 65°C; t = 40 min	<b>1</b>	Tampão pH 6,5 Celulase (0,35 g/L) Corante azul (1,74%)
<b>2</b>	Corante azul (1,7%) Corante vermelho (1%) Corante amarelo (1%) Cloreto de Sódio (60 g/L) Barrilha (3,0 g/L) Soda (1,13 g/L) T = 65°C; t = 60 min		Corante vermelho (1%) Corante amarelo (0,92%) Cloreto de Sódio (60 g/L) Barrilha (3,0 g/L) Soda (1,13 g/L) T = 65°C; t = 60 min
<b>3</b>	Lavação: T = 80°C; t = 5 min	<b>2</b>	Lavação: T = 80°C; t = 5 min
<b>4</b>	Detergente (1g/l); T = 95°C; t = 15 min	<b>3</b>	Detergente (1g/l); T = 95°C; t = 15 min
<b>5</b>	Lavação: T = 90°C; t = 10 min	<b>4</b>	Lavação: T = 90°C; t = 10 min
<b>6</b>	Lavação: Ácido acético (0,8 g/L); T = 50°C; t = 5 min	<b>5</b>	Lavação: Ácido acético (0,8 g/L); T = 50°C; t = 5 min
<b>7</b>	Lavação: T = 50°C; t = 5 min	<b>6</b>	Lavação: T = 50°C; t = 5 min



**Figura 10 (1):** Processo convencional de biopolimento e tingimento (a) tampão pH 6,5; (b) celulase (c) sal; (d) corante; (e) barrilha; (f) soda; (g) detergente; (h) ácido acético.



**Figura 10 (2):** Processo biopolimento e tingimento simultâneos (a) tampão pH 6,5; (b) celulase (c) sal; (d) corante; (e) barrilha; (f) soda; (g) detergente; (h) ácido acético.

### 3.5.4. Ensaio Piloto

Após a determinação das condições ideais de processo, o mesmo foi testado em uma máquina piloto de produção, com capacidade para 50 kg de tecido. A biopreparação realizada por esgotamento leva em consideração a relação entre a quantidade de tecido e o volume de banho. É um processo realizado em batelada, e o equipamento utilizado é o Cotton Flow conforme apresentado na Figura 11, onde também podem ser feitos todos os processos de preparação, alveamento, tingimento e lavagem dos tecidos.



**Figura 11:** Máquina Cotton Flow.

## CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos seguindo-se a metodologia apresentada no Capítulo 3.

### 4.1. Caracterização Enzimática

As enzimas pectinase, celulase e amilase foram caracterizadas quanto a sua atividade em diferentes combinações e concentrações enzimáticas, conforme planejamento estatístico apresentado na Tabela 6. Foi realizada a quantificação de proteínas presentes nas enzimas, assim como a eletroforese para determinação das respectivas massas moleculares.

#### 4.1.1. Quantificação de Proteínas e Eletroforese

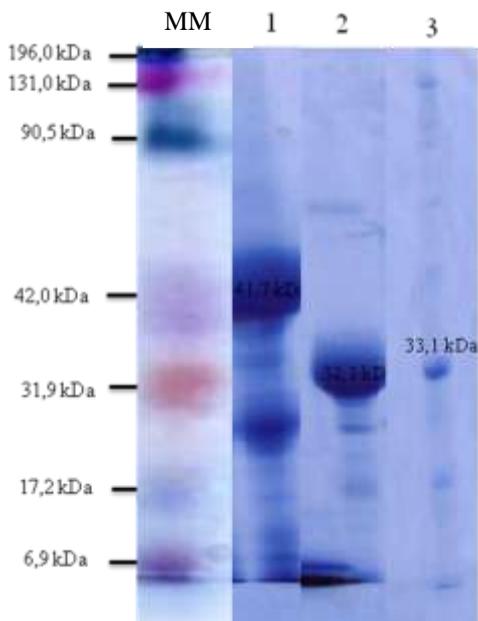
A Tabela 12 mostra os resultados de quantidade de proteínas presente nas amostras das preparações enzimáticas determinadas pelo método de Bradford (1976), baseado na ligação do corante Comassie Brilliant Blue G-250 à proteína, e da massa molecular das enzimas determinadas por eletroforese realizada segundo o método descrito por Laemmli (1970).

**Tabela 12:** Quantificação de proteína e massa molecular das enzimas pectinase, celulase e amilase.

	<b>Pectinase</b>	<b>Celulase</b>	<b>Amilase</b>
<b>Proteína Total (mg/mL)</b>	51	34	49
<b>Massa Molecular (kDa)</b>	41,7	32,3	33,1

Para que se tivesse uma melhor resolução da banda formada no gel, foi necessária a determinação de proteínas totais, de forma que a solução de amostra preparada obtivesse uma concentração de 50 mg/mL de proteína.

O perfil eletroforético em SDS-PAGE das enzimas pectinase, celulase e amilase é mostrado na Figura 12.



**Figura 12:** Perfil eletroforético em SDS-PAGE das enzimas pectinase (1), celulase (2) e amilase (3), comparadas com marcadores de massa molecular (MM).

Pode-se observar a presença de várias bandas, que indicam a presença de outros tipos de proteínas. Entretanto, é possível visualizar bandas mais fortes, indicando maior concentração de proteína para cada uma das enzimas estudadas.

O resultado obtido para a mancha mais concentrada da enzima pectinase (41,7 kDa) foi próximo ao encontrado por Yadav *et al.* (2008) na análise de uma pectato liase de *Aspergillus flavus*, apresentando massa molecular de 38 kDa. A celulase estudada apresentou massa molecular de 32,3 kDa, resultados semelhantes foram encontrados por Dyk *et al.* (2010) onde foram identificadas duas endoglucanases com massa molecular entre 25–27 kDa e 30–32 kDa, em celulase de *Bacillus licheniformis*. A enzima amilase apresentou massa molecular de 33,1 kDa, em pesquisa realizada por Murakami *et al.* (2008) cinco amilases foram purificadas e identificadas com a massa molecular estimada em 90, 85, 70, 65 e 58 kDa.

#### **4.1.2. Estudo do Pool Enzimático composto por Amilase, Pectinase e Celulase**

O efeito da combinação enzimática sobre a atividade das enzimas amilase, pectinase e celulase, conforme proposto no planejamento experimental, é apresentado na Tabela 13, assim como o comparativo entre os valores de atividade previstos e reais. A estatística descritiva desses dados é apresentada em separado nas Tabelas 14, 15 e 16.

Percebe-se na Tabela 13 que na análise das atividades das enzimas de forma individual (ensaios 1, 2 e 3), que existem atividades secundárias. Isto acontece porque as enzimas utilizadas neste trabalho são oriundas de fermentações clássicas, que apresentam atividades laterais de outras enzimas, no entanto, possuem como atividade principal amilase, pectinase e celulase.

**Tabela 13:** Valores médios reais e previstos das respostas medidas no planejamento de mistura, com cinco replicações para a determinação da melhor combinação enzimática sobre o *pool enzimático*.

Ensaio	Parâmetros		Atividade Pectinase (U/mL)				Atividade Amilase (U/mL)				Atividade Celulase (U/mL)		
	Pectinase	Amilase	Celulase	Real		Prevista		Real		Prevista		Real	Prevista
				Real	Prevista	Real	Prevista	Real	Prevista	Real	Prevista		
1	0%	100%	0%	1125	0	2386	2386	506	0	2386	2386	506	0
2	100%	0%	0%	4864	4864	678	0	757	0	0	0	757	0
3	0%	0%	100%	963	0	662	0	2235	2235	0	0	2235	2235
4	66,67%	33,33%	0%	4393	3581	1544	1234	699	667	1234	1234	699	667
5	0%	33,33%	66,67%	1050	1006	1675	1224	2123	1642	1224	1224	2123	1642
6	33,33%	0%	66,67%	3040	2240	744	661	2201	1725	661	661	2201	1725
7	33,33%	66,67%	0%	3412	2347	1989	1799	769	584	1799	1799	769	584
8	0%	66,67%	33,33%	1132	1059	1821	1793	1831	1071	1793	1793	1831	1071
9	66,67%	0%	33,33%	4202	3845	758	665	1945	1237	3845	665	1945	1237
10	33,33%	33,33%	33,33%	3201	2293	1625	1229	1872	1154	2293	1229	1872	1154
11	16,66%	66,67%	16,66%	2018	1674	2070	1789	1561	813	1674	1789	1561	813
12	66,67%	16,66%	16,66%	4029	3544	1496	935	1587	939	3544	935	1587	939
13	16,66%	16,66%	66,67%	1832	1593	1446	927	2052	1677	1593	927	2052	1677
14	33,33%	33,33%	33,33%	3230	2293	1635	1229	1880	1154	2293	1229	1880	1154

**Tabela 14:** Estatística descritiva da atividade da enzima pectinase.

<b>Atividade</b>						
<b>Pectinase</b>						
<b>(U/mL)</b>	<b>N</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>IC -95,00%</b>	<b>IC +95,00%</b>	
1125	5	23,801	10,6442	1095,447	1154,553	
4864	5	43,328	19,3768	4810,801	4918,399	
963	5	17,740	7,9335	941,173	985,227	
4393	5	12,621	5,6445	4377,728	4409,072	
1050	5	18,796	8,4060	497,261	543,939	
3040	5	20,428	9,1356	3015,035	3065,765	
3412	4	13,478	6,7392	3391,053	3433,947	
1132	5	16,103	7,2014	725,406	765,394	
4202	5	18,097	8,0932	4179,530	4224,470	
3201	10	25,553	8,0805	3197,221	3233,779	
2018	5	19,429	8,6891	1993,875	2042,125	
4029	4	15,055	7,5277	4005,043	4052,957	
1832	5	19,690	8,8057	1807,752	1856,648	
Total						
2653	68	1433,535	173,8416	2306,614	3000,592	

\* IC = Intervalo de 95% de Confiança para a média.

**Tabela 15:** Estatística descritiva da atividade da enzima amilase.

<b>Atividade</b>						
<b>Amilase</b>						
<b>(U/mL)</b>	<b>N</b>	<b>Desvio</b>	<b>Erro</b>	<b>IC</b>	<b>IC</b>	
		<b>Padrão</b>	<b>Padrão</b>	<b>-95,00%</b>	<b>+95,00%</b>	
2386	4	27,623	13,8112	2342,547	2430,453	
678	5	33,863	15,1439	636,154	720,246	
662	5	27,240	12,1819	628,177	695,823	
1544	5	13,885	6,2097	1527,159	1561,641	
1675	5	12,000	5,3666	1660,100	1689,900	
744	5	11,819	5,2858	730,124	759,476	
1989	4	40,019	20,0099	1925,570	2052,930	
1821	5	148,394	66,3638	1637,144	2005,656	
758	5	13,964	6,2450	740,661	775,339	
1625	10	22,852	7,2266	1609,352	1642,048	
2070	5	171,528	76,7096	1857,620	2283,580	
1496	5	13,846	6,1919	1479,008	1513,392	
1446	5	12,362	5,5281	1431,252	1461,948	
Total	1444	68	533,855	64,7395	1315,574	1574,015

\* IC = Intervalo de 95% de Confiança para a média.

**Tabela 16:** Estatística descritiva da atividade da enzima celulase.

<b>Atividade</b>					
<b>Celulase (U/mL)</b>	<b>N</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>IC</b>	
				<b>-95,00%</b>	<b>+95,00%</b>
506	4	22,876	11,43824	469,598	542,402
757	4	15,086	7,54293	733,745	781,755
2235	5	16,787	7,50733	2214,756	2256,444
699	5	21,970	9,82548	671,920	726,480
2123	5	17,824	7,9712	2101,068	2145,332
2201	5	18,743	8,38212	2178,327	2224,873
769	4	13,149	6,57489	748,826	790,674
1831	5	15,033	6,72309	1812,334	1849,666
1945	4	14,765	7,38241	1921,506	1968,494
1872	9	12,649	4,21637	1862,944	1882,390
1561	4	12,288	6,1441	1541,947	1581,053
1587	5	10,498	4,69468	1574,165	1600,235
2052	5	14,370	6,42651	2034,157	2069,843
Total					
1604	64	592,143	74,01782	1456,197	1752,022

\* IC = Intervalo de 95% de Confiança para a média.

## Análise da atividade da Enzima Pectinase

A Tabela 17 apresenta a Análise de Variância ANOVA da atividade da enzima pectinase para o planejamento de mistura. Foram testadas as significâncias de modelos cúbicos, quadrático e linear. Adotou-se um nível baixo com significância de 1% e um intervalo de 95% de confiança para as análises a seguir. O nível de 1% foi adotado por fornecer uma análise mais rigorosa dos dados experimentais.

Nota-se que o valor de  $p$  em todos os modelos foi menor que o nível de significância adotado.

**Tabela 17:** ANOVA da atividade da enzima pectinase em função das combinações enzimáticas.

<b>Modelos</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b><math>p</math></b>	<b><math>R^2</math></b>	<b><math>R^2</math> ajustado</b>
Linear	113711347	2	56855674	306,4713	$1,10^{-10}$	0,913554	0,910574
Quadrático	9467301	3	3155767	134,268	$1,10^{-10}$	0,989615	0,988670
Cúbico Especial	220295	1	220295	11,0928	0,001568	0,991384	0,990427
Cúbico							
Completo	305195	3	101732	6,7626	0,00063	0,993836	0,992749
Total	124471341	60	2074522				

\* SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática.

Para análise de significância escolheu-se o modelo cúbico completo cuja análise de falta de ajuste, é apresentada na Tabela 18. O coeficiente de determinação múltipla ( $R^2$  ajustado) mostrou alta concordância (0,992749). A falta de ajuste não foi significativa, pois o valor de  $p$  não excede o valor limite de (0,01), mostrando que o modelo cúbico completo é adequado.

**Tabela 18:** Análise de significância do modelo cúbico completo para atividade da enzima pectinase.

	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Modelo	123704138	9	13744904	913,6965	$1,10^{-10}$
Erro total	767202	51	15043		
Falta de ajuste	749791	3	249930	689,0127	$1,10^{-10}$
Erro puro	17411	48	363		
Total	124471341	60	2074522		

\*  $R^2 = 0,993836$ ;  $R^2$  ajustado = 0,992749

Os coeficientes estimados para o modelo cúbico completo são mostrados na Análise de Variância da Tabela 19, onde A = atividade amilase (U/mL), B = atividade pectinase (U/mL) e C = atividade celulase (U/mL). Observa-se que os fatores principais e as interações foram significativos. Para a resposta pectinase, verifica-se que as enzimas que não fazem parte desta metodologia (amilase e celulase) foram significativas sobre esta resposta. Pode-se concluir que a atividade secundária das enzimas amilase e celulase influenciam de forma positiva a atividade da pectinase, no sentido de facilitar seu acesso ao substrato, melhorando sua performance.

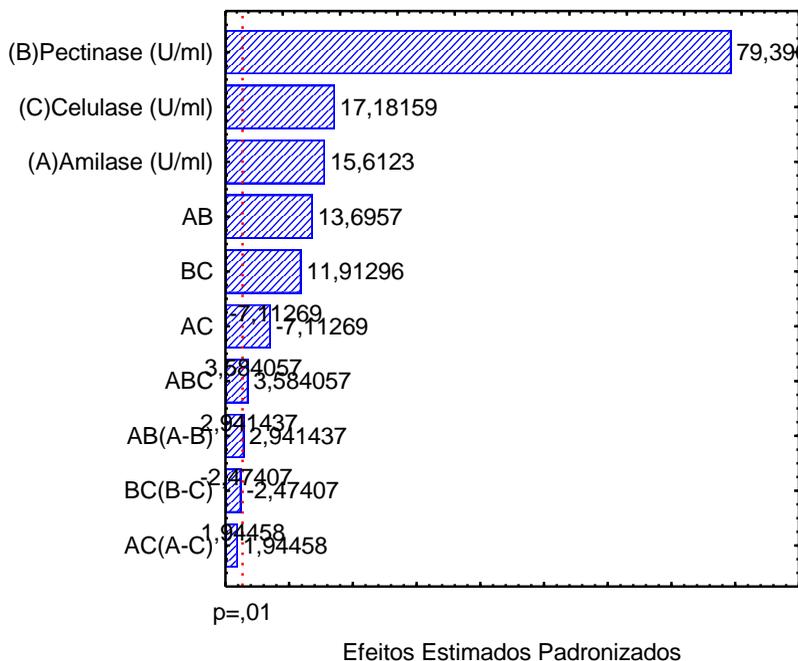
Logo, a presença delas em conjunto com a pectinase interfere no valor da atividade, dado os valores significativos dos termos AB, AC e BC. Há também uma interferência significativa do termo de interação de segunda ordem AB(A-B) que depende das concentrações relativas entre pectinase e amilase, podendo ser uma influência positiva ou negativa, ou mesmo nula, dependendo das concentrações adotadas destas enzimas. Os termos de interação de segunda ordem AC(A-C) e BC(B-C) não foram significativos.

**Tabela 19:** Coeficientes estimados no modelo cúbico para atividade da enzima pectinase com todos os termos.

	Erro		t(51)	P	IC	
	Efeito	Padrão			-95,00%	IC +95,00%
(A)Amilase (U/mL)	1101,46	70,551	15,6123	1,10 <sup>-10</sup>	959,83	1243,1
(B)Pectinase (U/mL)	4855,73	61,158	79,39633	1,10 <sup>-10</sup>	4732,95	4978,51
(C)Celulase (U/mL)	940,5	54,739	17,18159	1,10 <sup>-10</sup>	830,61	1050,39
AB	3932,29	287,119	13,6957	1,10 <sup>-10</sup>	3355,88	4508,71
AC	-1883,75	264,843	-7,11269	1,10 <sup>-10</sup>	-2415,44	-1352,05
BC	3090,63	259,434	11,91296	1,10 <sup>-10</sup>	2569,79	3611,46
ABC	5366,67	1497,373	3,58406	0,000756	2360,57	8372,77
AB(A-B)	1577,96	536,458	2,94144	0,004903	500,97	2654,94
AC(A-C)	946,38	486,677	1,94458	0,05735	-30,66	1923,43
BC(B-C)	-1225,74	495,436	-2,47407	0,016727	-2220,37	-231,11

\* IC = Intervalo de 95% de Confiança do efeito médio.

O gráfico de Pareto (Figura 13) mostra os valores do teste “t-Student” para cada efeito sobre a atividade da enzima pectinase. A linha tracejada indica a probabilidade limite de 1% como significativa.



**Figura 13:** Gráfico de Pareto dos efeitos estimados (valor absoluto) sobre a atividade da enzima pectinase.

Retirando-se os efeitos não significativos do modelo cúbico completo, foi recalculado o valor do  $R^2$  (0,992770) e  $R^2$  ajustado (0,991815) conforme Tabela 20 o que continua sendo um valor de boa concordância aos dados experimentais.

**Tabela 20:** Análise de significância do modelo cúbico para atividade da enzima pectinase, após retirada dos efeitos não significativos.

	SQ	GL	MQ	F	P
Modelo	123571380	7	17653054	1039,614	$1,10^{-10}$
Erro total	899961	53	16980		
Falta de ajuste	882550	5	176510	486,606	$1,10^{-10}$
Erro puro	17411	48	363		
Total	124471341	60	2074522		

\*  $R^2 = 0,992770$ ;  $R^2$  ajustado = 0,991815

**Tabela 21:** Coeficientes estimados no modelo cúbico para atividade da enzima pectinase, após retirada dos efeitos não significativos.

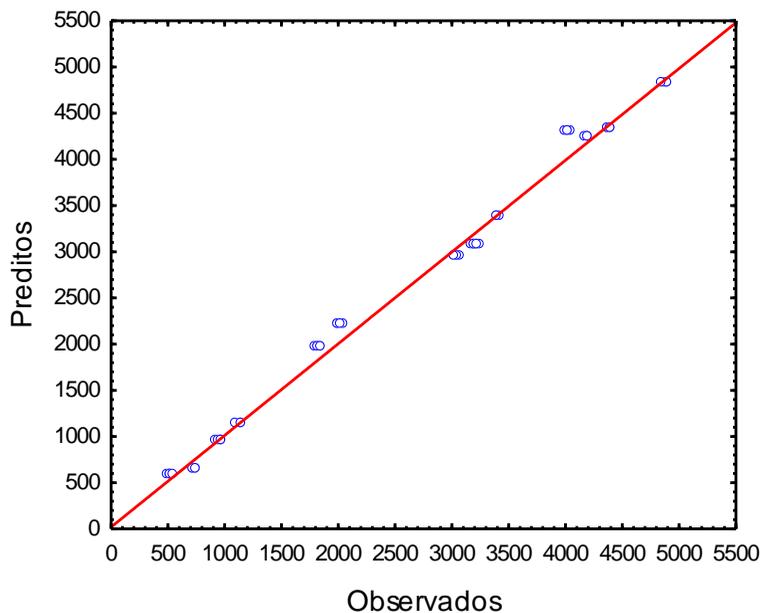
	Efeito	Erro Padrão	t(53)	P	IC	
					-95,00%	+95,00%
(A)Amilase (U/mL)	1137,36	71,373	15,93539	1,10 <sup>-10</sup>	994,21	1280,52
(B)Pectinase (U/mL)	4819,72	62,773	76,78025	1,10 <sup>-10</sup>	4693,81	4945,63
(C)Celulase (U/mL)	947,51	54,349	17,4337	1,10 <sup>-10</sup>	838,49	1056,52
AB	3950,47	302,514	13,05877	1,10 <sup>-10</sup>	3343,7	4557,23
AC	-1951	280,227	-6,96221	1,10 <sup>-10</sup>	2513,06	-1388,93
BC	3175,58	273,953	11,59173	1,10 <sup>-10</sup>	2626,11	3725,06
ABC	5181,28	1589,285	3,26013	0,001949	1993,58	8368,98
AB(A-B)	1798,58	564,402	3,1867	0,002414	666,53	2930,63

\* IC = Intervalo de 95% de Confiança dos efeitos médios.

Os resultados experimentais geraram um modelo empírico, cúbico, para a melhor resposta (Equação 4), onde A= amilase (U/mL), B= pectinase (U/mL) e C= celulase (U/mL).

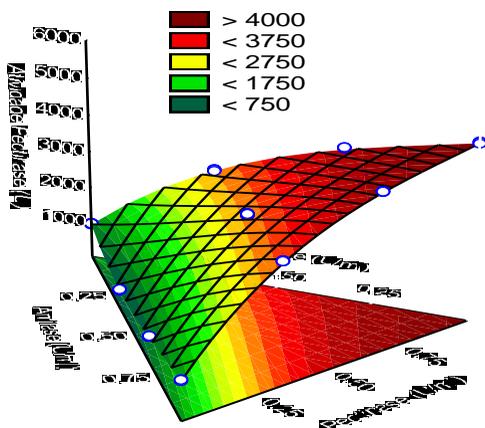
$$\begin{aligned}
 \text{Atividade Pectinase} = & 1137,36 A + 4819,72 B + 947,51 C + \\
 & 3950,47 AB - 1951 AC + 3175,58 BC + \\
 & 5181,28 ABC + 1798,58 AB(A-B) \quad (4)
 \end{aligned}$$

A Figura 14 mostra que a relação entre valores observados e preditos para o modelo cúbico é adequada.

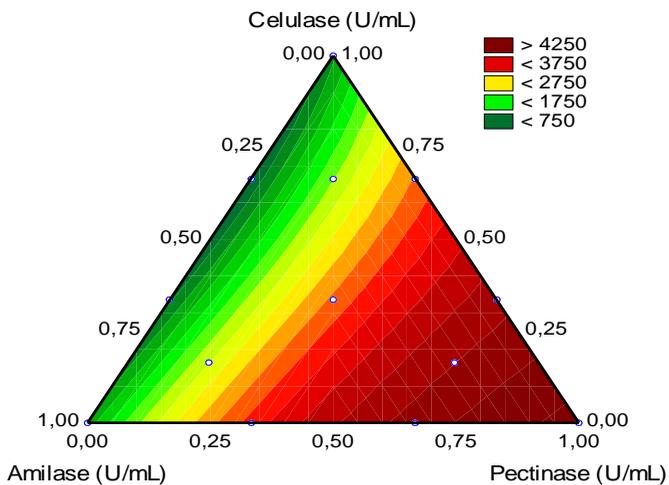


**Figura 14:** Relação entre valores observados e preditos do modelo cúbico para a atividade da pectinase.

A superfície de resposta gerada pelo modelo cúbico obtido segundo a Equação 4 são apresentadas na Figura 15 (a) e (b).



(a)



(b)

**Figura 15:** (a) e (b) Superfície de resposta do modelo cúbico para a atividade da enzima pectinase em função da concentração das enzimas pectinase, amilase e celulase.

Observou-se que para a resposta atividade da pectinase, os fatores principais celulase e amilase exercem influência positiva sobre a resposta.

Segundo a superfície de resposta plotada, o maior valor de atividade é obtida com 100% de pectinase, mas altos valores são obtidos para valores maiores que 70% de pectinase e menores que 30% de celulase e de amilase, o que indica a possibilidade de ser usada uma combinação enzimática no processo de biopreparação e otimizar custos conforme a resposta desejada.

Estudos realizados por Li e Hardin (1998) mostram que a combinação da pectinase com celulase permitiram reduzir a quantidade de enzima utilizada para obter a característica de umectabilidade pelo descrupe enzimático do algodão. A quantidade de pectinase P9179 usada em combinação foi três vezes menor e a quantidade de celulase C1184 foi oito vezes menor do que quando usadas individualmente. A ação das pectinases cria mais sítios disponíveis na parede primária da fibra do algodão para a ação das celulases, que por sua vez, criam mais sítios disponíveis na camada de substâncias pécticas para a ação das pectinases.

#### *Análise da Atividade da Enzima Amilase*

A Tabela 22 apresenta a Análise de Variância ANOVA da atividade da enzima amilase para o planejamento de mistura. Foram testadas as significâncias de modelos cúbicos, quadrático e linear. Adotou-se um nível baixo com significância de 1% e um intervalo de 95% de confiança para as análises a seguir. Observa-se que o valor de  $p$  não mostrou-se significativo apenas para o modelo cúbico especial ( $p > 0,01$ ), para os outros modelos foi menor que o nível de significância adotado.

**Tabela 22:** ANOVA da atividade da enzima amilase em função das combinações enzimáticas.

Modelos	SQ	GL	MQ	F	$p$	$R^2$	$R^2$ ajustado
Linear	13874490	2	6937245	162,7845	$1,10^{-10}$	0,848789	0,843574
Quadrático	1229617	3	409872	18,1488	$1,10^{-10}$	0,924012	0,917104
Cúbico							
Especial	134004	1	134004	6,5302	0,013455	0,93221	0,924678
Cúbico							
Completo	631626	3	210542	22,535	$1,10^{-10}$	0,97085	0,965706
Total	16346225	60	272437				

\* SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática.

Para análise de significância escolheu-se o modelo cúbico completo cuja análise de falta de ajuste, é apresentada na Tabela 23. O coeficiente de determinação múltipla ( $R^2$  ajustado) mostrou alta concordância (0,965706). A falta de ajuste não foi significativa, pois o valor de  $p$  não excede o valor limite de (0,01), mostrando que o modelo cúbico é adequado.

**Tabela 23:** Análise de significância do modelo cúbico para atividade da enzima amilase.

	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Modelo	15869737	9	1763304	188,732	$1,10^{-10}$
Erro total	476488	51	9343		
Falta de ajuste	258201	3	86067	18,9257	$1,10^{-10}$
Erro puro	218286	48	4548		
Total	16346225	60	272437		

\*  $R^2 = 0,97085$ ;  $R^2$  ajustado = 0,965706

Os coeficientes estimados para o modelo cúbico completo são mostrados na Análise de Variância da Tabela 24. Observa-se que os fatores principais e as interações foram significativos. Para a resposta amilase, verifica-se que as enzimas que não fazem parte desta metodologia (pectinase e celulase) foram significativas sobre esta resposta. A atividade secundária das enzimas pectinase e celulase, como observado nos ensaios do planejamento estatístico, influenciam de forma positiva a atividade da amilase, no sentido de facilitar seu acesso ao substrato.

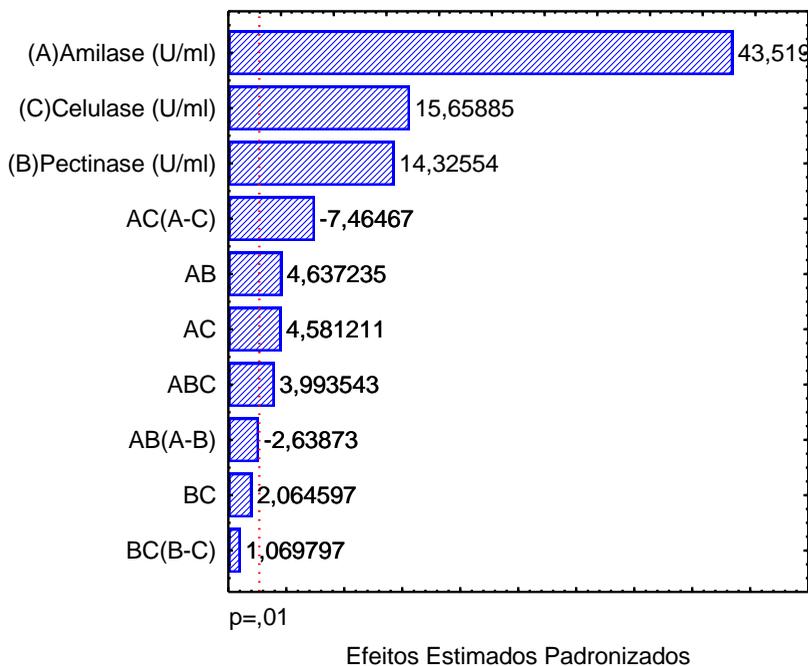
Logo, a presença das enzimas pectinase e celulase em conjunto com a amilase interfere no valor da atividade, dado os valores significativos dos termos AB e AC. Há também uma interferência significativa do termo de interação de segunda ordem AC(A-C) que depende das concentrações relativas entre amilase e celulase, podendo ser uma influência positiva ou negativa, ou mesmo nula.

**Tabela 24:** Coeficientes estimados no modelo cúbico completo para atividade da enzima amilase com todos os termos.

	<b>Efeito</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>t(51)</b>	<b>p</b>	<b>IC - 95,00%</b>	<b>IC +95,00%</b>
(A)Amilase (U/mL)	2419,66	55,6	43,51922	1,10 <sup>-10</sup>	2308,04	2531,28
(B)Pectinase (U/mL)	690,46	48,198	14,32554	1,10 <sup>-10</sup>	593,7	787,22
(C)Celulase (U/mL)	675,5	43,139	15,65885	1,10 <sup>-10</sup>	588,9	762,11
AB	1049,28	226,273	4,63723	0,000025	595,02	1503,54
AC	956,18	208,718	4,58121	0,00003	537,16	1375,2
BC	422,12	204,455	2,0646	0,044064	11,66	832,58
ABC	4712,58	1180,051	3,99354	0,000209	2343,53	7081,64
AB(A-B)	1115,58	422,772	-2,63873	0,011009	1964,33	-266,83
AC(A-C)	2863,01	383,541	-7,46467	1,10 <sup>-10</sup>	-3633	-2093,02
BC(B-C)	417,7	390,444	1,0698	0,289748	-366,15	1201,55

\* IC = Intervalo de 95% de Confiança do efeito médio.

O gráfico de Pareto (Figura 16) mostra os valores do teste “t-Student” para cada efeito sobre a atividade da enzima amilase. A linha tracejada indica a probabilidade limite de 1% como significante.



**Figura 16:** Gráfico de Pareto dos efeitos estimados (valor absoluto) sobre a atividade da enzima amilase.

Retirando-se os efeitos não significativos do modelo cúbico completo, foi recalculado o valor do  $R^2$  (0,9640) e  $R^2$  ajustado (0,9599) conforme Tabela 25 o que continua sendo um valor de boa concordância aos dados experimentais.

**Tabela 25:** Análise de significância do modelo cúbico para atividade da enzima amilase, após retirada dos efeitos não significativos.

	SQ	GL	MQ	F	p
Modelo	15757025	6	2626171	240,6875	$1,10^{-10}$
Erro total	589201	54	10911		
Falta de ajuste	370914	6	61819	13,5937	$1,10^{-10}$
Erro puro	218286	48	4548		
Total	16346225	60	272437		

\*  $R^2 = 0,9640$ ;  $R^2$  ajustado = 0,9599

**Tabela 26:** Coeficientes estimados no modelo cúbico para atividade da enzima amilase, após retirada dos efeitos não significativos.

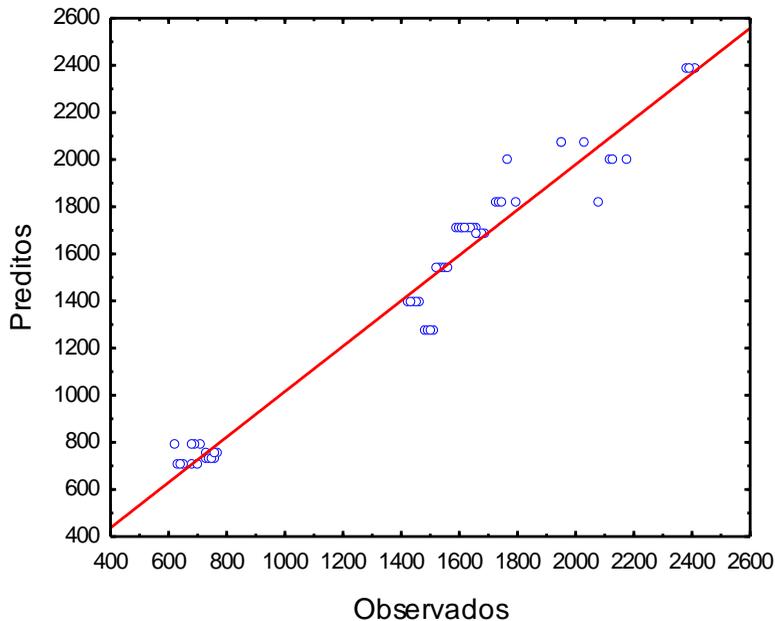
	Efeito	Erro Padrão	t(54)	p	IC	
					- 95,00%	+95,00%
(A)Amilase (U/mL)	2379,5	57,722	41,22316	1,10 <sup>-10</sup>	2263,77	2495,23
(B)Pectinase (U/mL)	782,13	40,978	19,08649	1,10 <sup>-10</sup>	699,97	864,29
(C)Celulase (U/mL)	700,7	38,775	18,07079	1,10 <sup>-10</sup>	622,96	778,44
AB	1013,65	230,937	4,3893	0,000053	550,65	1476,65
AC	945,37	216,476	4,36708	0,000057	511,36	1379,38
AC(A-C)	2859,91	408,58	-6,99963	1,10 <sup>-10</sup>	3679,06	-2040,75

\* IC = Intervalo de 95% de Confiança dos efeitos médios.

Os resultados experimentais geraram um modelo empírico, cúbico, para a melhor resposta (Equação 5), onde A = amilase (U/mL), B = pectinase (U/mL) e C = celulase (U/mL).

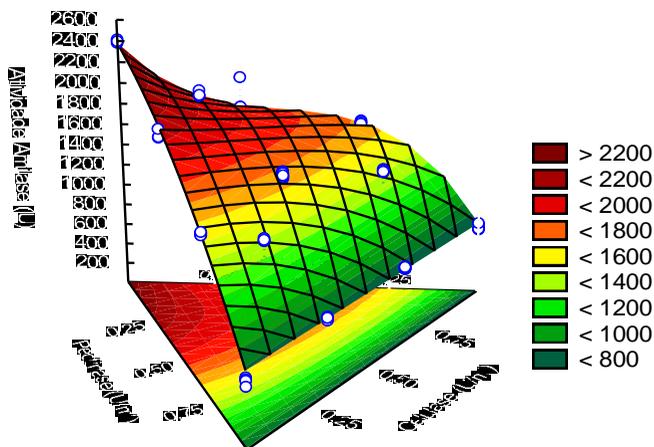
$$\begin{aligned} \text{Atividade Amilase} = & 2379,5 A + 782,13 B + 700,7 C + 1013,65 \\ & AB + 945,37 AC - 2859,91 AC (A-C) \end{aligned} \quad (5)$$

A Figura 17 mostra que a relação entre valores observados e preditos para o modelo cúbico é adequada.

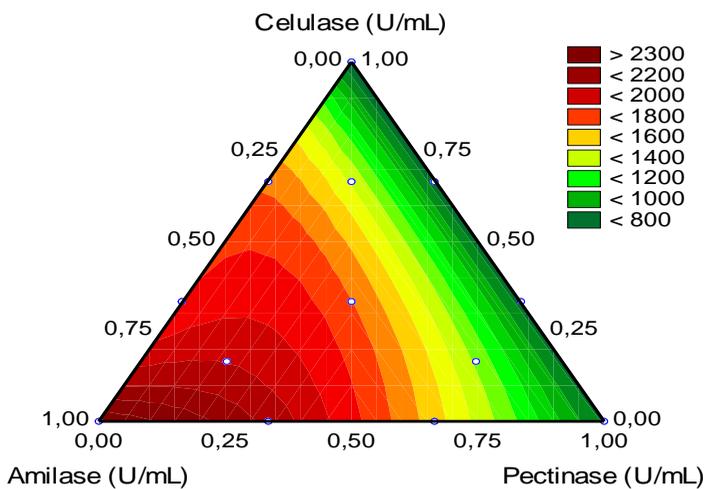


**Figura 17:** Relação entre valores observados e preditos do modelo cúbico para a atividade da amilase.

A superfície de resposta gerada pelo modelo cúbico obtido segundo a Equação 5 são apresentadas na Figura 18 (a) e (b).



(a)



(b)

**Figura 18:** (a) e (b) Superfície de resposta do modelo cúbico para a atividade da enzima amilase em função da concentração das enzimas pectinase, amilase e celulase.

Observou-se que para a reposta atividade da amilase, os fatores principais celulase e pectinase exercem influência positiva sobre a resposta.

Segundo a superfície de resposta plotada, o maior valor de atividade é obtida com 100% de amilase, mas altos valores são obtidos para valores maiores que 70% de amilase e menores que 30% de celulase e de pectinase.

### *Análise da Atividade da Enzima Celulase*

A Tabela 27 apresenta a Análise de Variância ANOVA da atividade da enzima celulase para o planejamento de mistura. Foram testadas as significâncias de modelos cúbicos, quadrático e linear. Adotou-se um nível baixo com significância de 1% e um intervalo de 95% de confiança para as análises a seguir. O nível de 1% foi adotado por fornecer uma análise mais rigorosa dos dados experimentais. Observa-se que o valor de  $p$  não mostrou-se significativo apenas para o modelo cúbico especial ( $p > 0,01$ ), em todos os outros modelos foi menor que o nível de significância adotado.

**Tabela 27:** ANOVA da atividade da enzima celulase em função das combinações enzimáticas.

Modelos	SQ	GL	MQ	F	$p$	$R^2$	$R^2$ ajustado
Linear	14983302	2	7491651	85,5413	$1,10^{-10}$	0,746816	0,738086
Quadrático	4113988	3	1371329	78,1092	$1,10^{-10}$	0,951871	0,947495
Cúbico							
Especial	43805	1	43805	2,5661	0,11501	0,954054	0,948949
Cúbico							
Completo	814443	3	271481	128,96	$1,10^{-10}$	0,994649	0,993704
Total	20062901	60	334382				

\* SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática.

Para análise de significância escolheu-se o modelo cúbico completo cuja análise de falta de ajuste, é apresentada na Tabela 28. O coeficiente de determinação múltipla ( $R^2$  ajustado) mostrou alta concordância (0,993704). A falta de ajuste não foi significativa, pois o valor de  $p$  não excede o valor limite de (0,01).

**Tabela 28:** Análise de significância do modelo cúbico para atividade da enzima celulase.

	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Modelo	19955538	9	2217282	1053,261	$1,10^{-10}$
Erro total	107363	51	2105		
Falta de ajuste	95023	3	31674	123,208	$1,10^{-10}$
Erro puro	12340	48	257		
Total	20062901	60	334382		

\*  $R^2 = 0,994649$ ;  $R^2$  ajustado = 0,993704

Os coeficientes estimados para o modelo cúbico completo são mostrados na Análise de Variância da Tabela 29. Observa-se que os fatores principais e as interações foram significativos. Para a resposta celulase, verifica-se que as enzimas que não fazem parte desta metodologia (amilase e pectinase) foram significativas sobre esta resposta. A atividade secundária das enzimas amilase e pectinase, como observado nos ensaios do planejamento estatístico, influenciam de forma positiva a atividade da celulase, no sentido de facilitar seu acesso ao substrato.

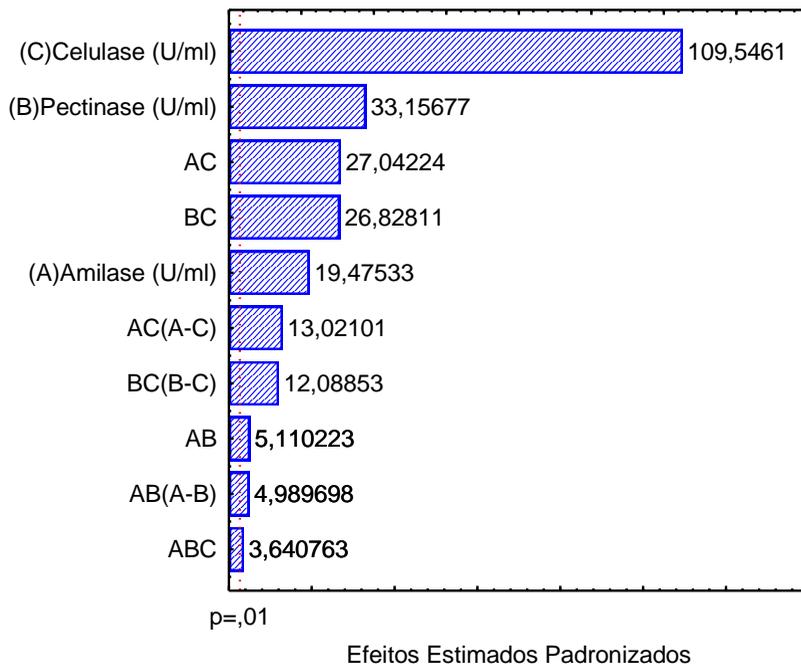
Logo, a presença delas em conjunto com a celulase interfere no valor da atividade, dado os valores significativos de todos os termos.

**Tabela 29:** Coeficientes estimados no modelo cúbico completo para atividade da enzima celulase com todos os termos.

	<b>Efeito</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>t(51)</b>	<b>p</b>	<b>IC -95,00%</b>	<b>IC +95,00%</b>
(A)Amilase (U/mL)	513,996	26,3922	19,4753	$1,10^{-10}$	461,012	566,981
(B)Pectinase (U/mL)	758,576	22,8785	33,1568	$1,10^{-10}$	712,645	804,506
(C)Celulase (U/mL)	2243,182	20,4771	109,5461	$1,10^{-10}$	2202,072	2284,291
AB	548,876	107,4074	5,1102	0,000005	333,246	764,505
AC	2679,194	99,0744	27,0422	$1,10^{-10}$	2480,293	2878,094
BC	2603,69	97,0508	26,8281	$1,10^{-10}$	2408,853	2798,528
ABC	2039,364	560,1474	3,6408	0,000635	914,821	3163,907
AB(A-B)	1001,342	200,6819	4,9897	0,000007	598,456	1404,228
AC(A-C)	2370,6	182,0595	13,021	$1,10^{-10}$	2005,1	2736,1
BC(B-C)	2240,443	185,3363	12,0885	$1,10^{-10}$	1868,365	2612,521

\* IC = Intervalo de 95% de Confiança do efeito médio.

O gráfico de Pareto (Figura 19) mostra os valores do teste “t-Student” para cada efeito sobre a atividade da enzima celulase. A linha tracejada indica a probabilidade limite de 1% como significante.



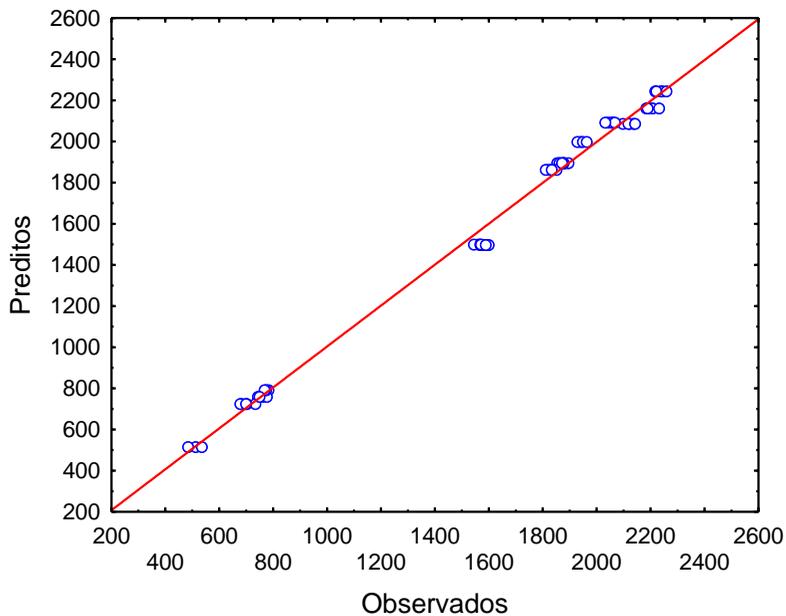
**Figura 19:** Gráfico de Pareto dos efeitos estimados (valor absoluto) sobre a atividade da enzima celulase.

Os resultados experimentais geraram um modelo empírico, cúbico, para a melhor resposta (Equação 6), onde A = amilase (U/mL), B = pectinase (U/mL) e C = celulase (U/mL).

$$\begin{aligned}
 \text{Atividade Celulase} = & 513,99 A + 758,58 B + 2243,18 C + 548,88 \\
 & AB + 2679,19 AC + 2603,69 BC + 2039,36 ABC + 1001,34 \\
 & AB(A-B) + 2370,60 AC(A-C) + 2240,44 BC(B-C)
 \end{aligned}$$

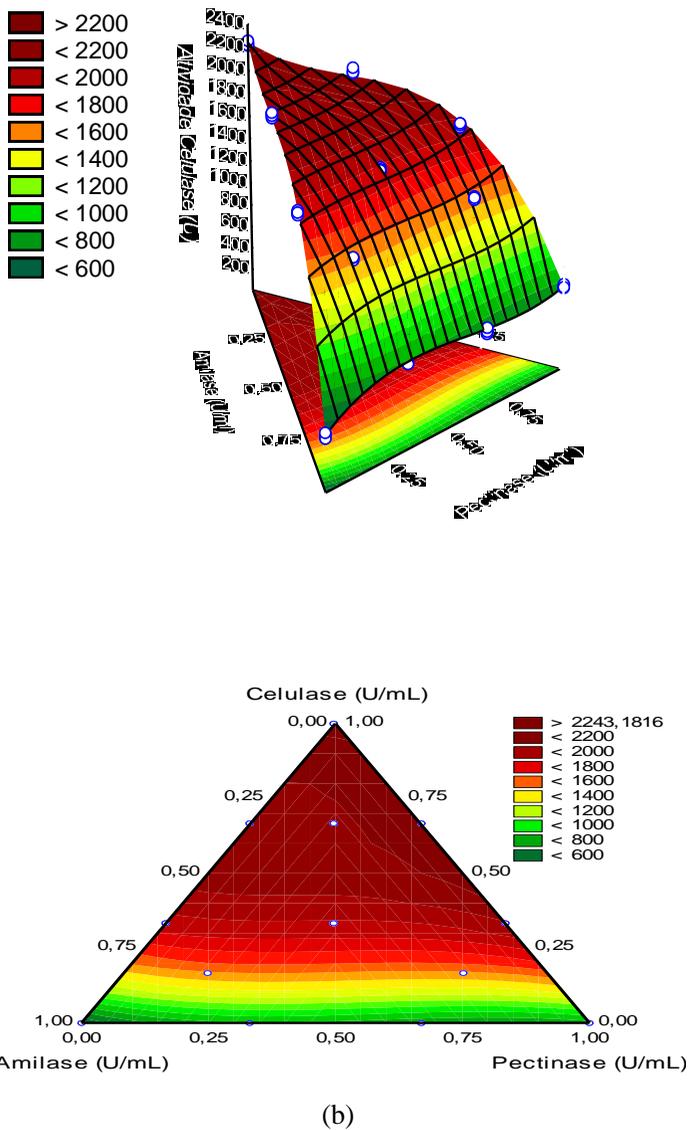
(6)

A Figura 20 mostra que a relação entre valores observados e preditos para o modelo cúbico completo é adequada.



**Figura 20:** Relação entre valores observados e preditos do modelo cúbico para a atividade da celulase.

A superfície de resposta gerada pelo modelo cúbico obtido segundo a Equação 6 são apresentadas na Figura 21 (a) e (b).



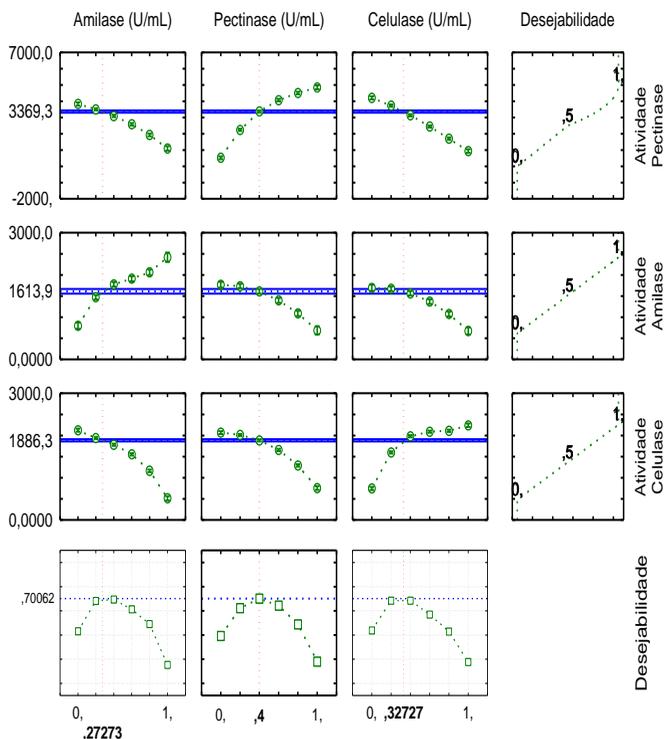
**Figura 21:** (a) e (b) Superfície de resposta do modelo cúbico para a atividade da enzima celulase em função da concentração das enzimas pectinase, amilase e celulase.

Observou-se que para a resposta atividade da celulase, os fatores principais amilase e pectinase exercem influência positiva sobre a resposta.

Segundo a superfície de resposta plotada, o maior valor de atividade é obtida com 100% de celulase, mas altos valores são obtidos para valores maiores que 25% de celulase e menores que 75% de pectinase e de amilase.

A Figura 22 apresenta os perfis de resposta preditos para as variáveis: atividade de pectinase, atividade de amilase e atividade de celulase em função das concentrações das enzimas no meio; nesta figura pode-se observar de forma integrada as diferenças nos modelos de atividade obtidos. Devido a este fato, foi feita uma otimização das respostas de modo a obter uma condição, contendo os valores de concentração das enzimas, que maximizasse as três atividades ao mesmo tempo. A função de otimização é chamada no programa Statistica de “desejabilidade”, também mostrada na Figura 22. Esta função normaliza os máximos e mínimos obtidos experimentalmente entre 0 e 1 para encontrar os máximos e mínimos das funções resposta modeladas.

Segundo a função de otimização, a máxima resposta das três atividades em conjunto é obtida nas seguintes concentrações das enzimas: 27% de amilase, 40% de pectinase e 33% de celulase, nas quais se deve obter um valor máximo na resposta da atividade combinada das três enzimas ao mesmo tempo.



**Figura 22:** Perfil para os valores preditos e desejabilidade para atividade das enzimas amilase, pectinase e celulase no *pool enzimático*.

A seguir serão analisados os ensaios experimentais com os níveis apresentados no planejamento de mistura a fim de verificar se a reposta obtida experimentalmente aproxima-se do valor esperado, obtendo-se uma comprovação da validade dessa análise.

#### 4.1.2.1. Resultados de Perda de Massa, Hidrofilidade, Grau de Alvura, Remoção de Pectina e Residual de Amido

Para avaliar o desempenho do pool enzimático nas diferentes combinações no substrato têxtil, tecido felpudo algodão cru, foi realizado ensaio de biopreparação com condições de pH 6,5,

temperatura 55°C e tempo de reação 20 min fixados, variando-se as concentrações enzimáticas de acordo com o planejamento experimental de mistura apresentado na Tabela 6.

Com o objetivo de avaliar o efeito da biopreparação no tecido, bem como comparar com o processo alcalino convencional, testes de hidrofiliidade, grau de alvura, perda de massa, remoção de substâncias pécéticas e residual de amido foram realizados.

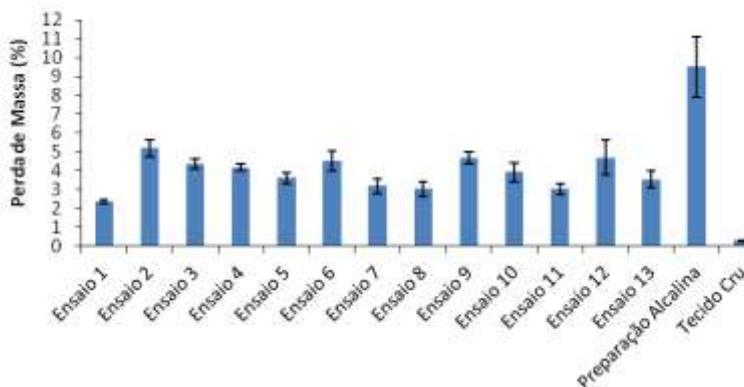
A perda de massa nos tecidos tratados através dos ensaios definidos no planejamento experimental, após os processos de biopreparação e preparação alcalina é apresentada na Figura 23. Os ensaios foram replicados 3 vezes.

Observa-se que os ensaios de biopreparação apresentaram menor perda de massa que o processo alcalino convencional. A perda de massa para o tecido tratado sem a adição de enzimas foi de 0,29%. Uma perda de massa muito alta durante o processo de preparação não é interessante, pois os produtos têxteis são comercializados em função de seu peso, e perder massa indica estar perdendo matéria-prima. No entanto, para a remoção de substâncias hidrófobas da fibra é necessário a retirada de material de sua superfície, logo deve-se obter percentuais de remoção que atendam a limpeza da fibra para proporcionar hidrofiliidade, porém, com a menor perda de massa possível.

A maior perda de massa foi com o ensaio 2 (5,18%) onde havia 100% da concentração (1 mL/L) da enzima pectinase, e a menor perda de massa com o ensaio 1 (2,34%) onde havia 100% da concentração (1 mL/L) de amilase, com 100% da concentração (1 mL/L) de celulase houve 4,62% de perda de massa. O resultado de perda de massa do tecido preparado alcalinamente foi de 9,5%, indicando uma porcentagem maior em relação ao processo de biopreparação. Este resultado está de acordo com resultados encontrados na literatura, indicando que a combinação de produtos químicos, principalmente hidróxido de sódio combinados a alta temperatura acarreta em uma condição mais agressiva, removendo completamente as impurezas da fibra e parte da própria fibra por degradação (BUSCHLE-DILLER *et al.*, 1998). Em estudos realizados por Csizsár *et al.* (2001), a perda de massa também foi maior para o ensaio com pectinase (2,6%) do que com celulase (2,4%) em 30 min de tratamento enzimático, indicando que, embora a maior parte da fibra seja composta por celulose, existe a necessidade das pectinas e ceras serem removidas antecipadamente para que as celulases possam atuar de forma mais eficiente.

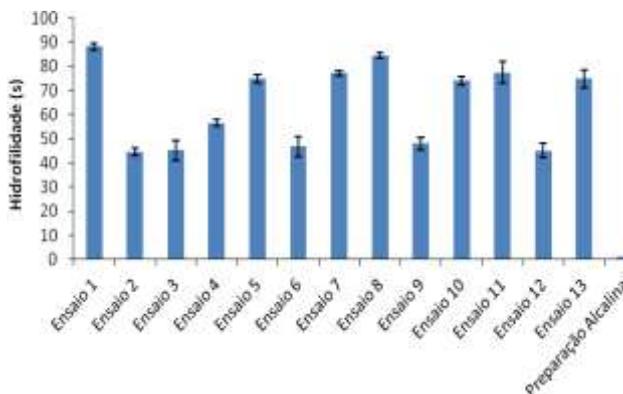
Dos ensaios 4 ao 13, onde as enzimas estão de forma combinada a variação de perda de massa ficou entre 3,02-4,67%.

As barras apresentadas em cada ensaio representam o desvio padrão de cada valor obtido experimentalmente.



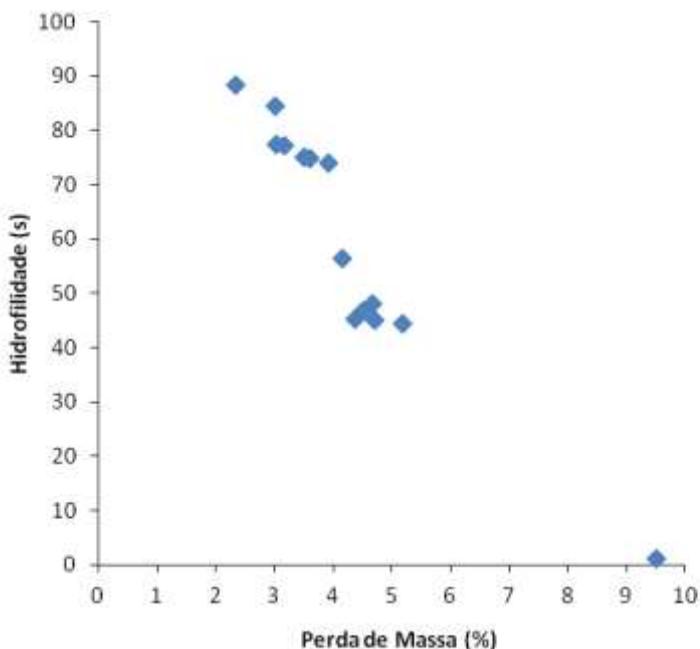
**Figura 23:** Resultados dos ensaios de perda de massa para as combinações enzimáticas testadas. Ensaios realizados a temperatura 55°C, pH 6,5 e tempo de reação de 20 min.

Na Figura 24 é apresentada a média dos resultados de hidrofiliidade para os tipos de ensaio realizados na biopreparação e na preparação alcalina convencional. O tecido de algodão cru não apresentou absorção de água.



**Figura 24:** Resultados dos ensaios de hidrofiliidade para as combinações enzimáticas testadas. Ensaios realizados a temperatura 55°C, pH 6,5 e tempo de reação de 20 min.

O tecido submetido à preparação alcalina apresentou absorção instantânea. Nenhum dos ensaios realizados apresentou absorção instantânea, indicando que mesmo após o processo de biopreparação permaneceu material hidrofóbico na superfície da fibra, entretanto o menor tempo para a umectação ocorreu com o ensaio 2 (100% pectinase), com o tempo de 45 s para absorção de água, e o maior tempo foi para o ensaio 1 (100% amilase), necessitando de 1 min e 28 s para absorção de água. Estes resultados estão de acordo com os valores de perda de massa obtidos que podem ser observados na Figura 25, sendo que quanto maior a quantidade de impurezas removidas (maior perda de massa) da fibra, maior será o grau de hidrofiliidade (absorção próxima a 0 s), e quanto mais impurezas permanecerem na fibra mais hidrófobica ela se encontra (absorção próxima a 90 s).



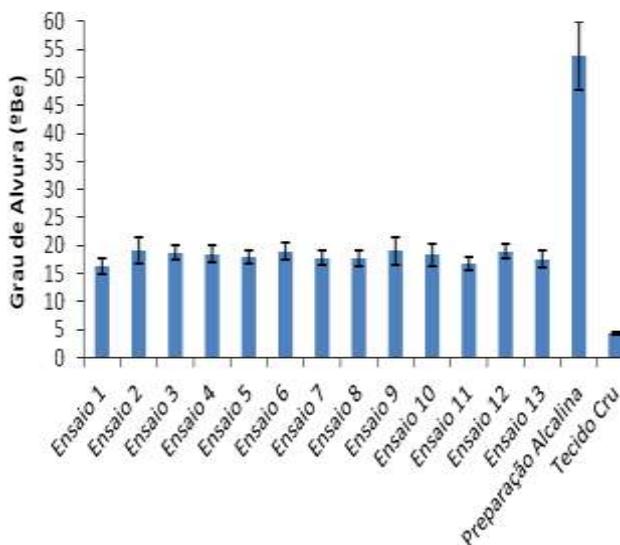
**Figura 25:** Comparativo entre os resultados dos ensaios de perda de massa e hidrofiliidade para as combinações enzimáticas testadas. Ensaios realizados a temperatura 55°C, pH 6,5 e tempo de reação de 20 min.

Embora os resultados deste estudo mostrem que existe hidrofiliidade nos tecidos tratados, tem-se necessidade de se melhorar este parâmetro melhorando as condições de processo. Ahlawat *et al.* (2009) estudaram a influência da temperatura e de agentes umectantes na etapa de biopreparação de tecidos de algodão, e concluíram que sem uma boa umectação do substrato o resultado da biopreparação não é significativo.

A Figura 26 ilustra as variações encontradas no grau de alvura, para os ensaios, após o processo de biopreparação, utilizando a preparação alcalina como referência. Observa-se que todos os ensaios de biopreparação, de 1 a 13 apresentaram grau de alvura inferior ao da preparação alcalina (53,9 °Berger), que foi, em média, 18,2 °Berger. O tecido cru apresentou grau de alvura de 4,3 °Berger. Quanto ao grau de alvura devido ao processo enzimático, verifica-se que não houve diferença significativa entre as combinações enzimáticas.

Visando a obtenção de um melhor resultado de branqueamento, pode-se aumentar o tempo de reação e/ou a concentração enzimática, como observado por Kalantzi *et al.* (2008) passando de 36,5 para 51,2 °Berger com o aumento da concentração enzimática de 200 para 750 U/g tecido e 3 horas de tratamento.

Segundo Freitas (2009) há uma relação entre a concentração de surfactantes com o grau de alvura, e o aumento da concentração de surfactante aumenta o grau de alvura das amostras tratadas enzimaticamente. No entanto, deve-se levar em consideração que o grau de alvura elevado só traz benefícios para o tingimento de cores claras. Como para a maioria dos tecidos que sofrem o processo de purga enzimática ou biopreparação são destinados a tingir cores médias e escuras, este parâmetro não deve ser comparado ao padrão de preparação alcalina convencional. Estudos realizados por Pimentel (2010) mostraram que com o grau de alvura em torno  $19,5 \pm 1,5$  °Berger e o tecido hidrofílico são aptos a seguir para as próximas etapas do beneficiamento.



**Figura 26:** Resultados dos ensaios de grau de alvura para as combinações enzimáticas testadas. Ensaios realizados a temperatura 55°C, pH 6,5 e tempo de reação de 20 min.

Como citado na revisão bibliográfica o tecido deve estar livre da maior parte de suas impurezas para obter um tingimento uniforme, neste caso tratando-se de um tecido onde os fios são engomados (amido) para garantir que o processo de tecelagem seja eficiente, houve então a necessidade da adição da enzima amilase para remoção do amido no processo de preparação. O percentual de residual de goma adotado pelas indústrias têxteis, situa-se na faixa entre 0,20-0,30%, que corresponde a uma nota 6 na escala Tegewa.

Com o objetivo de encontrar qual a melhor combinação enzimática para prosseguir com os ensaios de otimização de processo, e posterior tingimento dos tecidos felpudos algodão, é feita uma análise nos resultados de perda de massa, hidrofiliidade, grau de alvura, residual de amido e pectina removida, nos ensaios de 1 a 13 realizados nesta etapa do trabalho, conforme mostra a Tabela 30.

**Tabela 30:** Análise dos valores médios da perda de massa, hidrofiliade, grau de alvura, residual de amido e pectina removida do tecido, com três replicações para a determinação da melhor combinação enzimática sobre o *pool enzimático*.

Ensaio	Parâmetros			Perda de Massa (%)	Hidrof. (s)	Grau de Alvura (°Be)	Residual Amido (%)	Pectina Removida (%)
	Pectinase	Amilase	Celulase					
1	0%	100%	0%	2,3	88	16,3	< 0,1	20
2	100%	0%	0%	5,2	44	19,1	0,90-1,50	91
3	0%	0%	100%	4,4	45	18,7	0,90-1,50	17
4	66,67%	33,33%	0%	4,2	56	18,5	0,14-0,20	81
5	0%	33,33%	66,67%	3,6	75	17,9	0,14-0,20	18
6	33,33%	0%	66,67%	4,5	47	18,9	0,90-1,50	55
7	33,33%	66,67%	0%	3,2	77	17,7	0,10-0,14	65
8	0%	66,67%	33,33%	3,0	84	17,6	0,10-0,14	20
9	66,67%	0%	33,33%	4,7	48	19,0	0,90-1,50	80
10	33,33%	33,33%	33,33%	3,9	74	18,3	0,14-0,20	61
11	16,66%	66,67%	16,66%	3,0	77	16,7	0,10-0,14	40
12	66,67%	16,66%	16,66%	4,7	45	18,9	0,14-0,20	77
13	16,66%	16,66%	66,67%	3,5	75	17,5	0,14-0,20	38
14	33,33%	33,33%	33,33%	4,0	72	18,5	0,14-0,20	61

Os ensaios 1, 2 e 3 com 100% das enzimas amilase, pectinase e celulase, respectivamente, foram necessários para o conhecimento do seu comportamento de forma isolada, porém não atendem os requisitos necessários para posterior tingimento.

Com o ensaio 1 obtêm-se a melhor remoção de amido, residual menor que 0,1%, representando uma nota 9 na escala Tegewa, e embora exista atividade das enzimas pectinase e celulase, a remoção de substâncias pécicas (20% de remoção) não é suficiente para proporcionar bons resultados de grau de alvura ( $16,3 \pm 1,5$  °Berger) e hidrofiliidade (88 s), requisitos necessários para garantir o acesso dos corantes à fibra e um tingimento uniforme.

O ensaio 2 é o mais eficiente na remoção de pectinas do tecido, proporcionando uma remoção de 91%, grau de alvura de  $19,1 \pm 2,3$  °Berger e hidrofiliidade de 44 s, porém a quantidade de amido removido (0,90-1,50%) não atende o percentual mínimo de remoção exigido para posterior tingimento que é de 0,20-0,30%. A enzima celulase encontrada em 100% de sua concentração no ensaio 3 visa auxiliar o acesso das outras enzimas à fibra de algodão proporcionando uma ação mais eficaz.

Os ensaios 6 (66% celulase e 33% pectinase) e 9 (66% pectinase e 33% celulase), não atendem a remoção de amido exigidos, apresentando percentuais em torno de 0,90-1,50%, que corresponde a nota 3 na escala Tegewa, logo estas combinações podem ser eliminadas.

Os ensaios 5 (66% celulase e 33% amilase), 8 (66% amilase e 33% celulase), 11 (17% pectinase, 66% amilase e 17% celulase) e 13 (17% pectinase, 17% amilase e 66% celulase) também podem ser eliminados, já que a remoção de pectinas ficou com percentuais abaixo de 40% e hidrofiliidade acima de 75 s.

Em estudos realizados por (dissertação) Pimentel (2010) a remoção de substâncias pécicas ficou entre 40 e 60%, e apesar de existirem diversos trabalhos envolvendo a enzima pectinase a remoção de pectina em percentuais não é apresentada dentro das principais referências, portanto os ensaios que apresentaram valores de remoção inferiores a 40% foram eliminados, devido à sua pouca hidrofiliidade e baixo grau de alvura.

Para os ensaios 10 e 12 temos as 3 enzimas agindo simultaneamente, e nos ensaios 4 e 7 o sinergismo de 2 enzimas (amilase e pectinase), porém todos estes ensaios atendem os requisitos de tratamento para o tecido, conforme podem ser observados os resultados apresentados na Tabela 31.

Para auxiliar na escolha da melhor combinação enzimática foi realizado um estudo econômico das receitas, considerando o custo das

enzimas (1 kg pectinase R\$ 9,00, 1 kg amilase R\$ 10,00 e 1 kg celulase R\$ 8,50), para uma máquina de 330 kg de tecido e R.B. 1:7, conforme mostra a Tabela 31.

**Tabela 31:** Análise econômica das combinações enzimáticas.

Ensaio	Parâmetros			PM (%)	H (s)	GA (°Be)	Residual de Amido (%)	Pectina Removida (%)	Custo da Receita (R\$)
	Pectinase	Amilase	Celulase						
<b>4</b>	66,67%	33,33%	0%	4,2	56	18,5	0,14-0,20	81	22,71
<b>7</b>	33,33%	66,67%	0%	3,2	77	17,7	0,10-0,14	65	23,53
<b>10</b>	33,33%	33,33%	33,33%	3,9	74	18,3	0,14-0,20	61	22,31
<b>12</b>	66,67%	16,66%	16,66%	4,7	45	18,9	0,14-0,20	77	22,10

Com base nos resultados e análise econômica obtidos, o ensaio que melhor atende aos requisitos necessários para a etapa de tingimento é o ensaio 12, pois além de possuir o menor custo de receita, apresenta maior grau de alvura (18,9 °Be), menor hidrofiliidade (45 s), e ótima remoção de amido e pectina. A Tabela 32 apresenta a comparação entre os processos de biopreparação e preparação alcalina. O ensaio de biopreparação foi realizado a temperatura de 55°C, pH 6,5 e tempo de reação de 20 min, e a preparação alcalina foi realizada a temperatura de

95°C, pH 10-12 e tempo de reação de 25 min, ambos os processos com R.B. 1:10.

**Tabela 32:** Comparação entre os resultados dos processos de biopreparação e preparação alcalina.

	<b>Biopreparação</b>	<b>Preparação Alcalina</b>
<b>Perda de Massa (%)</b>	4,7 ± 0,9	9,5 ± 1,6
<b>Hidrofilidade (s)</b>	45 ± 3,0	< 1
<b>Grau de Alvura (°Be)</b>	18,9 ± 1,3	53,9 ± 6,1
<b>Remoção Pectina (%)</b>	77	100
<b>Residual de Amido (%)</b>	0,14-0,20	0,20-0,30

Como pode ser observado, o processo de biopreparação na combinação enzimática 66% pectinase, 17% amilase e 17% celulase, fornece melhores resultados de perda de massa e remoção de amido em relação ao processo alcalino convencional, quanto aos resultados de hidrofilidade, grau de alvura e remoção de substâncias pécnicas, embora sejam adequados para seguir para a etapa de tingimento, ainda podem ser melhorados com a otimização das condições do processo.

Desta forma, o uso combinado e simultâneo das enzimas estudadas no trabalho mostra-se relevante e aplicável em escala de produção, pois a redução de produtos químicos, tempo, consumo de energia e água é uma das formas de garantir competitividade e qualidade nos produtos gerados pela indústria têxtil.

#### **4.2. Atividade Enzimática em Função do Tempo de Reação, pH e Temperatura**

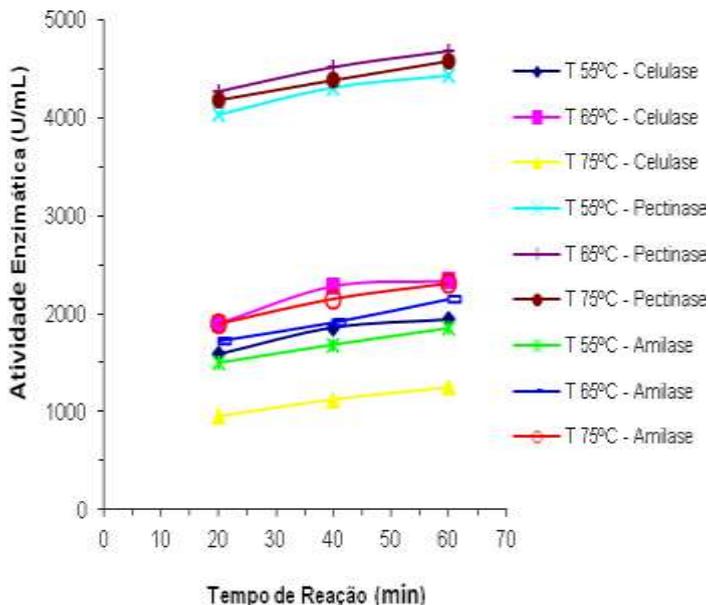
O planejamento 3<sup>3</sup> realizado para avaliar a influência do tempo de reação, pH e temperatura sobre a atividade na combinação enzimática 66% pectinase, 17% amilase e 17% celulase, é apresentado na Tabela 33. Os ensaios foram replicados 3 vezes.

**Tabela 33:** Resposta do planejamento experimental 3<sup>3</sup> utilizado para avaliar a influência do tempo de reação, pH e temperatura sobre a atividade enzimática.

Ensaio	Tempo (min)	pH	T (°C)	Atividade		Atividade		Atividade	
				Pectinase (U/mL)	Desvio Padrão	Amilase (U/mL)	Desvio Padrão	Celulase (U/mL)	Desvio Padrão
1	20	5,5	55	3103	110,18	813	110,12	1006	105,03
2	20	5,5	65	3642	154,05	1032	145,16	1302	112,07
3	20	5,5	75	3383	126,11	1213	130,03	812	90,12
4	20	6,5	55	4029	15,05	1495	14,98	1585	10,49
5	20	6,5	65	4272	95,09	1716	150,00	1895	166,04
6	20	6,5	75	4182	161,04	1892	164,04	951	95,03
7	20	7,5	55	4391	145,02	693	90,18	782	80,07
8	20	7,5	65	4491	120,03	896	100,03	1101	83,61
9	20	7,5	75	4402	100,11	1121	120,14	616	92,02
10	40	5,5	55	3332	180,03	938	105,16	152	158,05
11	40	5,5	65	3991	170,01	1211	135,12	1611	115,01
12	40	5,5	75	3671	180,02	1392	166,06	991	90,05
13	40	6,5	55	4302	200,05	1680	110,15	1856	120,02
14	40	6,5	65	4516	171,11	1906	124,13	2280	132,59

15	40	6,5	75	4382	160,04	2146	135,02	1121	167,12
16	40	7,5	55	4581	190,10	924	96,04	1031	140,20
17	40	7,5	65	4781	100,04	1138	138,12	1392	112,15
18	40	7,5	75	4626	125,02	1330	158,11	852	105,08
19	60	5,5	55	3438	127,51	1178	129,13	1341	160,00
20	60	5,5	65	4116	115,02	1412	143,04	1690	185,00
21	60	5,5	75	3827	131,46	1521	164,02	1022	108,10
22	60	6,5	55	4422	175,03	1846	151,00	1936	144,03
23	60	6,5	65	4675	155,00	2142	139,12	2332	203,05
24	60	6,5	75	4571	160,02	2303	112,15	1243	122,14
25	60	7,5	55	4692	165,04	1091	128,03	1128	124,00
26	60	7,5	65	4915	190,00	1290	147,30	1431	97,17
27	60	7,5	75	4746	178,10	1506	173,10	966	103,16

Os dados obtidos nos experimentos quanto à atividade das enzimas pectinase, amilase e celulase, em função do tempo de reação, são apresentados na Figura 27.



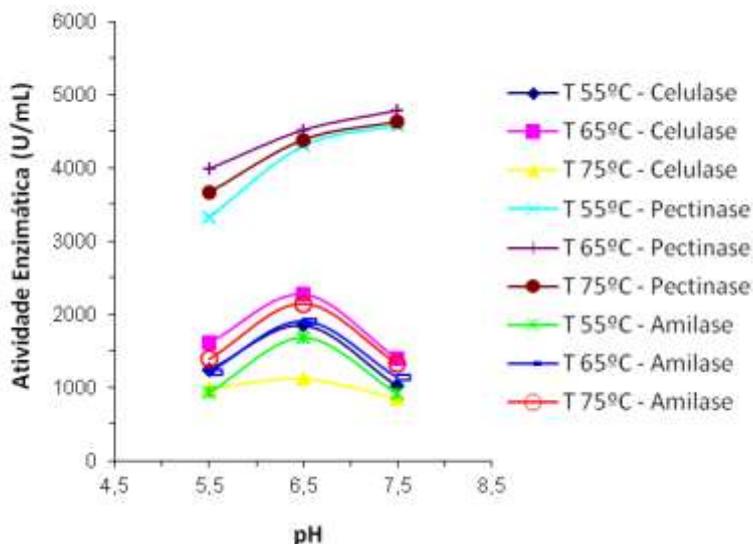
**Figura 27:** Atividade enzimática em função do tempo de reação, temperatura entre 55-75°C, pH 6,5.

Visando avaliar a atividade enzimática em função do tempo de reação, foram realizados ensaios nos tempos de 20, 40 e 60 min. O tempo de reação de atividade máxima ocorre a 60 min para as três enzimas estudadas.

Se for considerada a atividade enzimática por minuto, nota-se que a diferença entre as atividades a 40 min e 60 min é de 119 (55°C), 160 (65°C) e 189 (75°C) U/mL para a pectinase, 81 (55°C), 53 (65°C) e 121 (75°C) U/mL para a celulase e 167 (55°C), 253 (65°C) e 157 (75°C) U/mL para a amilase, o que poderia ser considerada praticamente a mesma, já que o desvio padrão apresenta valores similares às diferenças, conforme apresentado na Tabela 32, o que justificaria a utilização do tempo de reação de 40 min, obtendo uma redução de 20 min no tempo de processo. Tempos longos de processo não são necessários para

remoção dos compostos da cutícula, como já apresentado em literatura (Lenting *et al.*, 2002).

Na Figura 28, são apresentadas a atividade enzimática das enzimas pectinase, amilase e celulase, em função do pH nas temperaturas de 55°C, 65°C e 75°C, após 40 min de reação enzimática.



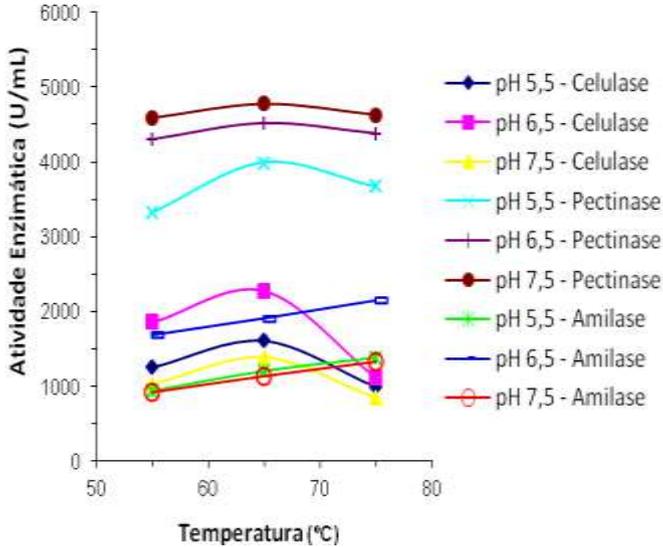
**Figura 28:** Atividade enzimática em função do pH, temperatura entre 55-75°C, tempo de reação de 40 min.

Os resultados mostram que a atividade máxima foi obtida com pH 6,5 para as enzimas celulase e amilase, e pH 7,5 para a pectinase.

Como o objetivo do trabalho é a utilização combinada das enzimas, procura-se a melhor condição que satisfaça as três enzimas agindo simultaneamente. Considerando a utilização do pH 6,5 para a pectinase, a sua atividade de 100% em pH 7,5 passou para 94% (T=55°C), 94% (T=65°C) e 95% (T=75°C), que ainda são considerados ótimos valores de atividade enzimática. Em trabalho anterior de Shafiei *et al.* (2010) obteve a atividade máxima em pH 7,5 para a enzima amilase e manteve 81% da atividade quando o pH passou para 6,5. Gummadi e Kumar (2006) encontraram que a faixa ótima de pH para uma pectinase alcalina estava entre pH 7-8.

Resultados semelhantes foram encontrados por Wang *et al.* (2009) na análise da atividade celulolítica, o pH ótimo encontrado foi de 7,5 e mais de 80% da atividade foi mantida na faixa entre pH 6,5 a 8,5.

A atividade das enzimas pectinase, amilase e celulase, em função da temperatura, nos pHs 5,5, 6,5 e 7,5, após 40 min de reação é apresentada na Figura 29.



**Figura 29:** Atividade enzimática em função da temperatura, tempo de reação de 40 min, pH entre 5,5-7,5.

Como toda reação, as enzimas, sofrem incremento na cinética com o aumento da temperatura. Porém esse comportamento ocorre até a temperatura de máxima atividade. A partir dessa, o incremento de temperatura diminui a cinética enzimática devido à desnaturação da enzima.

A atividade da amilase aumenta progressivamente até a temperatura máxima estudada de 75°C. Enquanto que para as enzimas pectinase e celulase a atividade aumenta até 65°C, e começa a diminuir gradativamente. Para aplicação industrial, torna-se interessante trabalhar com temperaturas mais baixas porque, o uso de uma temperatura inferior garante um menor consumo de energia no processo.

A amilase apresenta de 78 a 89% de sua atividade inicial em pH 6,5 com temperatura entre 55 a 65°C. As enzimas pectinase e celulase, em pH 6,5, apresentam cerca de 81 a 100% e 95 a 100%, respectivamente, de sua atividade na faixa de temperatura de 55 a 65°C.

*Análise Estatística das Atividades das Enzimas Pectinase, Amilase e Celulase*

As Tabelas 34, 35 e 36 apresentam a Análise de Variância ANOVA das atividades das enzimas pectinase, amilase e celulase para o planejamento fatorial completo 3<sup>3</sup>. Adotou-se um nível de significância de 5% e um intervalo de 95% de confiança para todas as análises.

**Tabela 34:** Análise de Variância (ANOVA) da atividade da enzima pectinase.

	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
(1) Tempo (min) (L)	2049452	1	2049452	91,5423	1,10 <sup>-10</sup>
Tempo (min) (Q)	63052	1	63052	2,8163	0,099
(2) pH (L)	1386994	1	13869494	619,505	1,10 <sup>-10</sup>
pH (Q)	1161457	1	1161457	51,8785	1,10 <sup>-10</sup>
(3) Temperatura (°C) (L)	375167	1	375167	16,7575	0,0001
Temperatura (°C) (Q)	1237864	1	1237864	55,2913	1,10 <sup>-10</sup>
1L por 2L	8587	1	8587	0,38336	0,5383
1L por 3L	5575	1	5575	0,249	0,6198
2L por 3L	201451	1	201451	8,9982	0,0041
Falta de ajuste	390366	17	22963	1,0257	0,4472
Erro puro	1208953	54	22388	-	-
Total	20571419	80	-	-	-

\* SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática.  $R^2 = 0,9223$ ;  $R^2$  ajustado = 0,9124. L = efeito linear. Q = efeito quadrático.

**Tabela 35:** Análise de Variância (ANOVA) da atividade da enzima amilase.

	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
(1) Tempo (min) (L)	1948260	1	1948260	110,7453	1,10 <sup>-10</sup>
Tempo (min) (Q)	1624	1	1624	0,0923	0,7623
(2) pH (L)	86320	1	86320	4,9067	0,0309
pH (Q)	10204656	1	10204656	580,0651	1,10 <sup>-10</sup>

(3) Temperatura (°C) (L)	2362956	1	2362956	134,3179	1,10 <sup>-10</sup>
Temperatura (°C) (Q)	9068	1	9068	0,5154	0,4758
1L por 2L	3885	1	3885	0,2209	0,6402
1L por 3L	28	1	28	0,0016	0,9681
2L por 3L	642	1	642	0,0365	0,8449
Falta de ajuste	39439	17	2320	0,1319	0,4491
Erro puro	949982	54	17592	-	-
Total	15606861	80	-	-	-

\* SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática.  $R^2 = 0,9366$ ;  $R^2$  ajustado = 0,9286. L = efeito linear. Q = efeito quadrático.

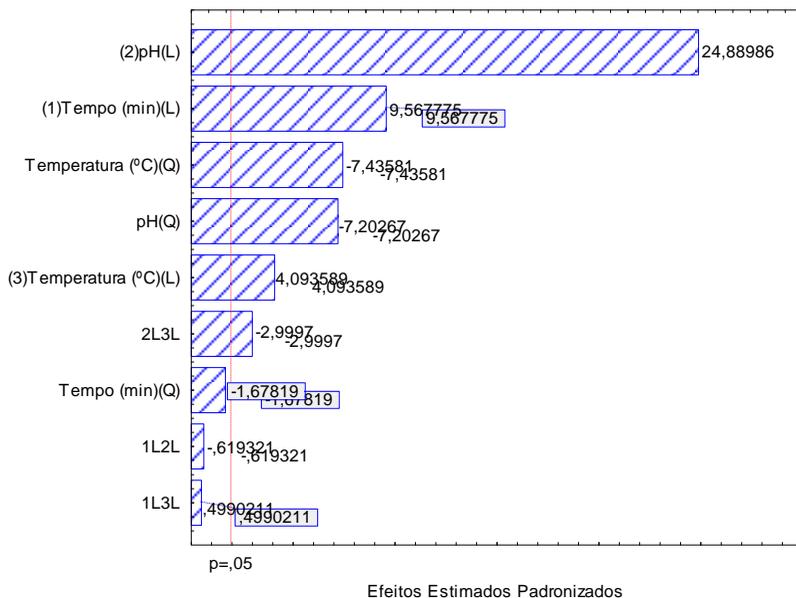
**Tabela 36:** Análise de Variância (ANOVA) da atividade da enzima celulase.

	SQ	GL	MQ	F	p
(1) Tempo (min) (L)	1541618	1	1541618	98,1942	1,10 <sup>-10</sup>
Tempo (min) (Q)	148210	1	148210	9,4403	0,0033
(2) pH (L)	498817	1	498817	31,7724	1,10 <sup>-10</sup>
pH (Q)	5637336	1	5637336	359,0733	1,10 <sup>-10</sup>
(3) Temperatura (°C) (L)	1860751	1	1860751	118,5216	1,10 <sup>-10</sup>
Temperatura (°C) (Q)	5093723	1	5093723	324,4476	1,10 <sup>-10</sup>
1L por 2L	2209	1	2209	0,1407	0,709
1L por 3L	8130	1	8130	0,5178	0,4748
2L por 3L	17645	1	17645	1,1239	0,2938
Falta de ajuste	1064780	17	62634	3,9895	1,10 <sup>-10</sup>
Erro puro	847783	54	15700	-	-
Total	16721001	80	-	-	-

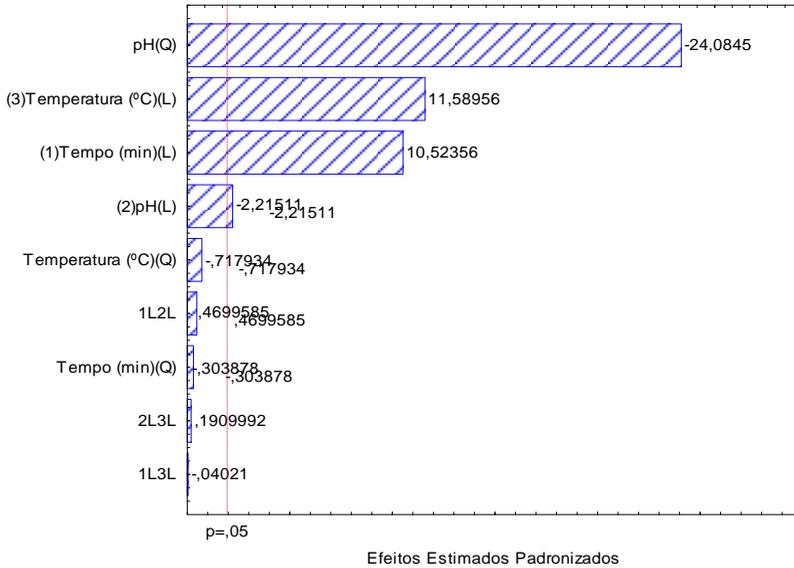
\* SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática.  $R^2 = 0,8856$ ;  $R^2$  ajustado = 0,8711. L = efeito linear. Q = efeito quadrático.

O gráfico de Pareto (Figuras 30, 31 e 32) mostra os valores do teste “t-Student” para cada efeito sobre a atividade das enzimas

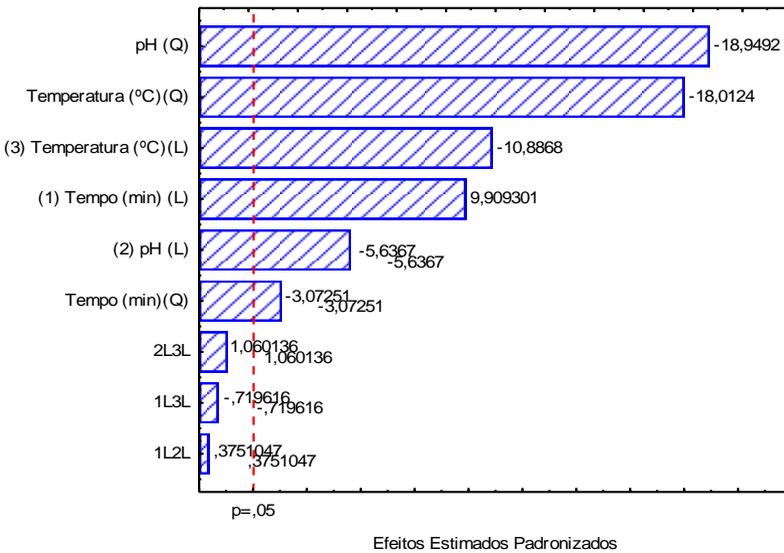
pectinase, amilase e celulase, respectivamente. A linha tracejada indica a probabilidade limite de 5% como significativa.



**Figura 30:** Gráfico de Pareto dos efeitos estimados (valor absoluto) sobre a atividade da enzima pectinase.



**Figura 31:** Gráfico de Pareto dos efeitos estimados (valor absoluto) sobre a atividade da enzima amilase.



**Figura 32:** Gráfico de Pareto dos efeitos estimados (valor absoluto) sobre a atividade da enzima celulase.

Retirando-se os efeitos não significativos dos modelos quadráticos, foram recalculados os valores de  $R^2$  e  $R^2$  ajustado para cada enzima, conforme as Tabelas 37, 38 e 39 apresentando valores de boa concordância aos dados experimentais.

**Tabela 37:** Coeficientes estimados do modelo quadrático para atividade da enzima pectinase, após retirada dos efeitos não significativos e ajuste do modelo.

	Efeito	Erro Padrão	t(54)	p	IC -95,00%	IC +95,00%
(1) Tempo (min) (L)	9,7	1,018	9,56	$1,10^{-10}$	7,7	11,3
	429					
(2) pH (L)	5	486	8,82	$1,10^{-10}$	3319	5271
	-					
pH (Q)	254	35	-7,203	$1,10^{-10}$	-324	-183
(3) Temperatura (°C) (L)	397	48	8,175	$1,10^{-10}$	300	495
Temperatura (°C) (Q)	-2,6	0,353	-7,436	$1,10^{-10}$	-3,3	-1,9
2L por 3L	-7,5	2,494	-2,999	0,0041	-12,5	-2,5

\* IC = Intervalo de 95% de Confiança dos efeitos médios.  $R^2 = 0,9185$ ;  $R^2$  ajustado = 0,9119.

**Tabela 38:** Coeficientes estimados do modelo quadrático para atividade da enzima amilase, após retirada dos efeitos não significativos e ajuste do modelo.

	Efeito	Erro Padrão	t(54)	p	IC -95,00%	IC +95,00%
(1) Tempo (min) (L)	9,5	0,902	10,5236	$1,10^{-10}$	7,7	11,3
(2) pH (L)	9748	406,814	23,9625	$1,10^{-10}$	8932	10563
	-					
pH (Q)	-752	31,263	24,0845	$1,10^{-10}$	-815	-690
(3) Temperatura (°C) (L)	20	1,805	11,5896	$1,10^{-10}$	17,3	24,5

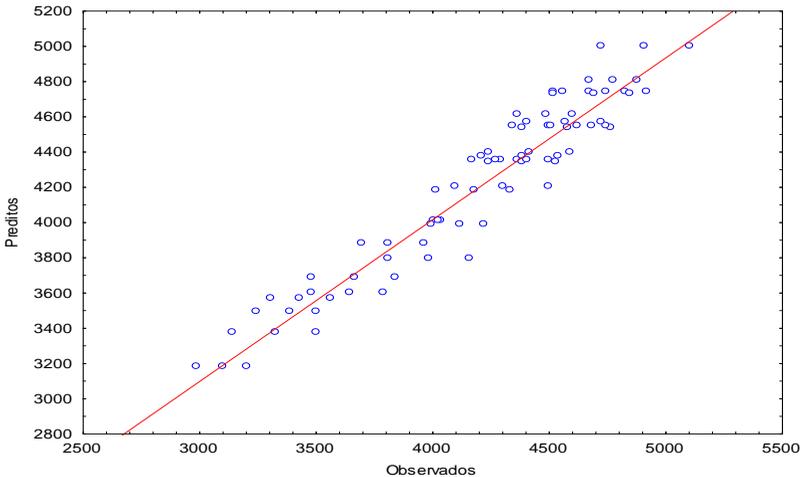
\* IC = Intervalo de 95% de Confiança dos efeitos médios.  $R^2 = 0,9356$ ;  $R^2$  ajustado = 0,9322.

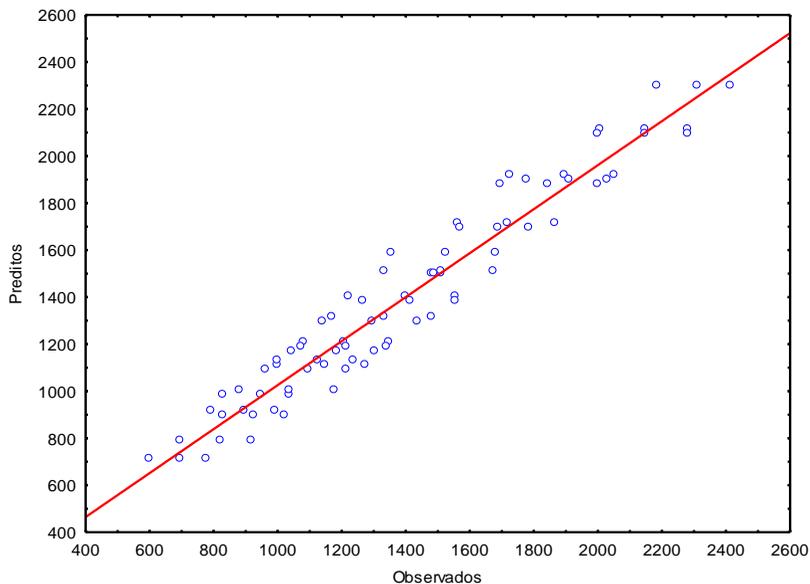
**Tabela 39:** Coeficientes estimados do modelo quadrático para atividade da enzima celulase, após retirada dos efeitos não significativos e ajuste do modelo.

	Efeito	Erro Padrão	t(54)	<i>p</i>	IC -95,00%	IC +95,00%
(1) Tempo (min) (L)	26,6	5,968	4,4566	$1,10^{-10}$	14,6	38,6
Tempo (min) (Q)	-0,2	0,074	-3,0725	0,003	-0,4	-0,1
(2) pH (L)	7179	384	18,6805	$1,10^{-10}$	6408,6	7949,6
pH (Q)	-559	29,53	-18,9492	$1,10^{-10}$	-618,8	-500,4
(3) Temperatura (°C) (L)	673	38,4	17,5117	$1,10^{-10}$	595,9	750
Temperatura (°C) (Q)	-5,3	0,295	-18,0124	$1,10^{-10}$	-5,9	-4,7

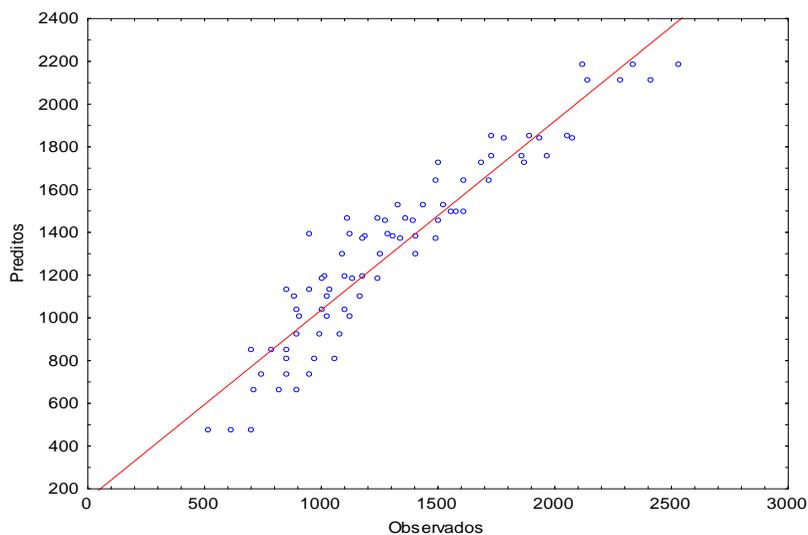
\* IC = Intervalo de 95% de Confiança dos efeitos médios.  $R^2 = 0,8895$ ;  $R^2$  ajustado = 0,8754.

As Figuras 33, 34 e 35 mostram que a relação entre valores observados e preditos é adequada. A falta de ajuste obtida no ANOVA não foi significativa, pois o valor de *p* não excede o valor limite de (0,05), mostrando que o modelo obtido pode ser utilizado para modelar os dados experimentais.

**Figura 33:** Relação entre valores observados e preditos do modelo quadrático para a atividade da pectinase.



**Figura 34:** Relação entre valores observados e preditos do modelo quadrático para a atividade da amilase.



**Figura 35:** Relação entre valores observados e preditos do modelo quadrático para a atividade da celulase.

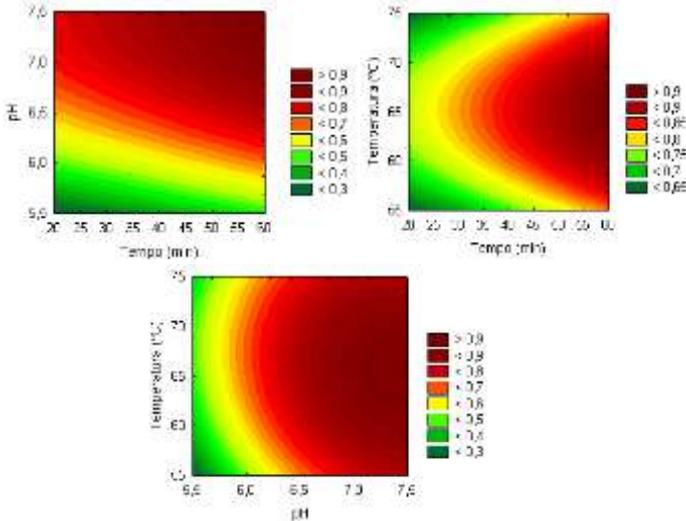
Os resultados experimentais geraram um modelo estatístico quadrático para a melhor resposta (Equações 7, 8 e 9), onde L= Linear e Q= Quadrático.

$$\begin{aligned} \text{Atividade Pectinase} = & 9,7*\text{Tempo} + 4295*\text{pH} - 397*\text{Temperatura} - 254*(\text{pH})^2 - \\ & 2,6*(\text{Temperatura})^2 - 7,5*\text{pH}* \text{Temperatura} \quad (7) \end{aligned}$$

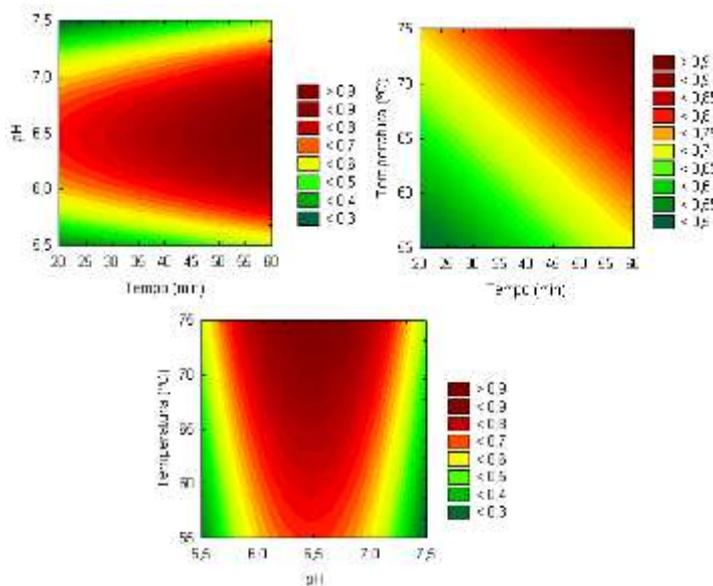
$$\text{Atividade Amilase} = 99,5*\text{Tempo} + 9748*\text{pH} + 20*\text{Temperatura} - 752*(\text{pH})^2 \quad (8)$$

$$\text{Atividade Celulase} = 26,6*\text{Tempo} + 7179*\text{pH} + 673*\text{Temperatura} - 0,2*(\text{Tempo})^2 - 559*(\text{pH})^2 - 5,3*(\text{Temperatura})^2 \quad (9)$$

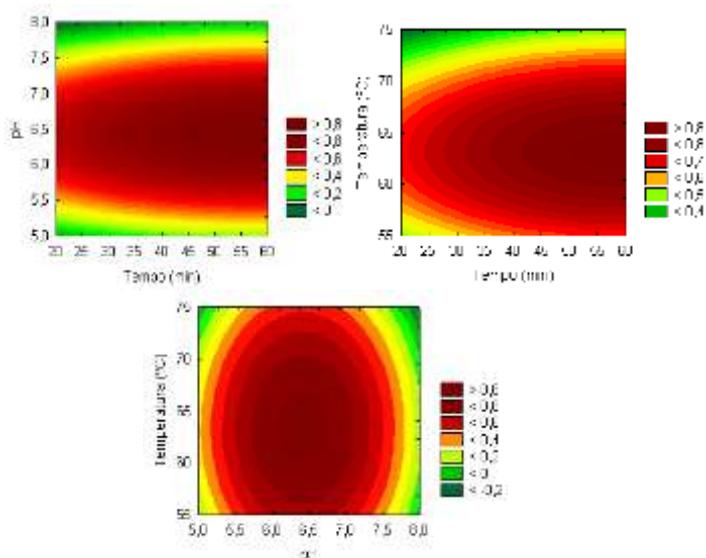
As superfícies de resposta geradas pelo modelos quadráticos para as atividades das enzimas, obtidos segundo as Equações 7, 8 e 9 são apresentadas na Figuras 36, 37 e 38, respectivamente.



**Figura 36:** Superfície de resposta do modelo quadrático para a atividade da enzima pectinase em função do pH, temperatura e tempo de reação.



**Figura 37:** Superfície de resposta do modelo quadrático para a atividade da enzima amilase em função do pH, temperatura e tempo de reação.



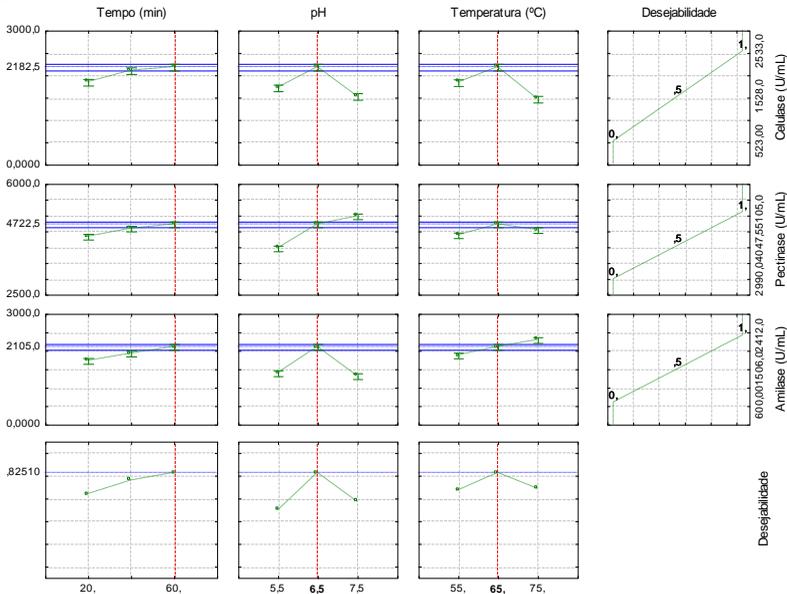
**Figura 38:** Superfície de resposta do modelo quadrático para a atividade da enzima celulase em função do pH, temperatura e tempo de reação.

Segundo a superfície de resposta plotada na Figura 36, o maior valor de atividade para a enzima pectinase é obtida com pH 7,5, temperatura de 65°C e tempo de reação de 60 min.

Conforme pode ser observado na Figura 37, a superfície de resposta plotada para a enzima amilase, apresenta valores de atividade máximos em pH 6,5, temperatura de 75°C e tempo de reação de 60 min.

A superfície de resposta plotada para a atividade da enzima celulase (Figura 38), apresenta valores máximos em pH 6,5, temperatura de 65°C e tempo de reação de 60 min.

A Figura 39 apresenta a função de otimização composta obtida (“desejabilidade”) para os perfis de resposta preditos para as variáveis: atividade de pectinase, atividade de amilase e atividade de celulase em função do pH, temperatura e tempo de reação; nesta figura pode-se observar de forma integrada os valores destas variáveis dependentes que produzem a máxima resposta para a três enzimas ao mesmo tempo, ou seja, foi feita uma otimização das respostas de modo a obter uma condição, contendo os valores de pH, temperatura e tempo de reação, que maximizasse as três atividades ao mesmo tempo.



**Figura 39:** Perfil para os valores preditos e desejabilidade para atividade das enzimas amilase, pectinase e celulase em função do pH, temperatura e tempo de reação.

Segundo a função de otimização, a máxima resposta das três atividades em conjunto é obtida nas seguintes condições: pH 6,5, temperatura de 65°C e tempo de reação de 60 min, nas quais se deve obter um valor máximo na resposta da atividade combinada das três enzimas ao mesmo tempo.

### *Resumo*

As três enzimas estudadas pertencem à mesma classe de enzimas, são hidrolíticas, mas apresentam como era esperado, comportamentos diferentes à variação do pH e temperatura do meio.

De acordo com a ferramenta estatística utilizada neste trabalho, as condições ideais de processo seriam pH 6,5, temperatura de 65°C e tempo de reação de 60 min. Na Tabela 40 são apresentadas as condições de tempo de reação, pH e temperatura a que se verifica maior velocidade de reação hidrolítica, obtidas experimentalmente.

**Tabela 40:** Resultados obtidos experimentalmente para as três enzimas.

	Condições sugeridas pelo Fornecedor		Condições obtidas Experimentalmente			
	Tempo de Reação (min)	pH	T (°C)	Tempo de Reação (min)	pH	T (°C)
Pectinase	30-60	6,5-8,5	55-75	60	7,5	65
Celulase	30-60	5,0-7,0	50-110	60	6,5	65
Amilase	30-60	5,5-7,0	50-110	60	6,5	75

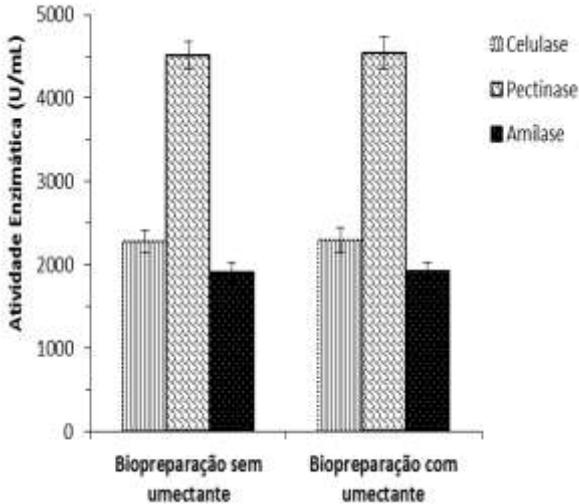
Muitas vezes uma combinação enzimática não permite o uso em processos industriais, pois as enzimas apresentam oscilações durante o processo e rápida desnaturação, além de tempos longos desnecessários. Por isso, foi realizado neste trabalho um estudo e determinado a condição de pH ótimo de processo (6,5), na temperatura de 65°C, durante 40 min de reação, que atenda as três enzimas visando à futura aplicação industrial do processo.

### **4.3. Efeito de Agentes Químicos**

O estudo dos agentes umectante (Quimifen COT) e sequestrante (Quilatan ABT), ambos não-iônicos, na atividade enzimática e seus efeitos sobre a perda de massa, hidrofiliidade, grau de alvura, remoção de substâncias pécnicas e residual de amido foram avaliados.

### 4.3.1. Efeito do Umectante no Processo de Biopreparação

O umectante foi utilizado no início do processo na concentração de 1 g/L, combinação enzimática 66% pectinase, 17% amilase e 17% celulase, pH 6,5, temperatura 65°C, durante 40 min de reação, tendo como principal objetivo melhorar os resultados de hidrofiliidade. Os resultados experimentais de biopreparação com e sem umectante são apresentados na Figura 41.



**Figura 41:** Resultado do efeito do umectante no processo de biopreparação. Ensaio realizado a pH 6,5, T=65°C, tempo de reação de 40 min, RB: 1:10.

Os valores de atividade não tiveram alterações significativas para as três enzimas estudadas, indicando que o umectante Quimifen COT na concentração testada não afeta a atividade, mostrando-se compatível com as enzimas, como já observado em estudos anteriores com outros tipos de umectantes não-iônicos (González *et al.*, 2008; Shafiei *et al.*, 2010).

A Tabela 41 apresenta os resultados de perda de massa, hidrofiliidade, grau de alvura, remoção de substâncias pécicas e residual de amido.

**Tabela 41:** Efeito do agente umectante na biopreparação.

	<b>Biopreparação sem umectante</b>	<b>Biopreparação com umectante</b>
<b>Perda de Massa (%)</b>	5,1 ± 0,4	5,3 ± 0,3
<b>Hidrofilidade (s)</b>	38 ± 1,2	< 1
<b>Grau de Alvura (°Be)</b>	20 ± 1,9	22 ± 2,4
<b>Remoção Pectina (%)</b>	85	85
<b>Residual de Amido (%)</b>	0,10-0,14	0,10-0,14

\* pH 6,5, T=65°C, tempo de reação de 40 min, RB: 1:10.

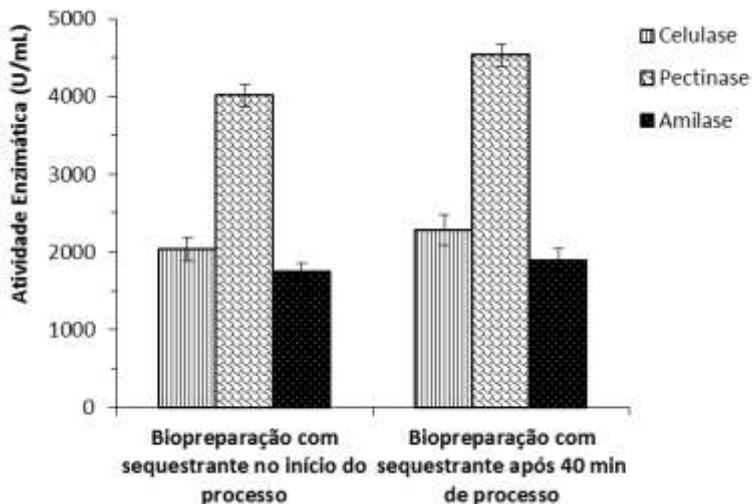
Com a adição do umectante houve uma melhoria na biopreparação, principalmente em relação à hidrofilidade do substrato têxtil, podendo ser atribuído à tensão superficial das fibras causada pela presença do umectante, facilitando a atuação das enzimas no substrato. Logo, o umectante mostra-se como um componente necessário na composição enzimática para a biopreparação, visto que apresenta um alto impacto na remoção de substâncias hidrófobas.

#### **4.3.2. Efeito do Sequestrante no Processo de Biopreparação**

O sequestrante não-iônico foi utilizado no início do processo e após o tempo de reação enzimática, na concentração de 0,5 g/L, nas condições citadas no item 3.3.3.

Foram estudados dois processos de biopreparação: processo 1) adição do agente sequestrante no início do processo (Figura 8 (1)); processo 2) o agente sequestrante foi adicionado após 40 min de tratamento enzimático e deixado por mais 10 min (Figura 8 (2)).

Na Figura 42, temos a atividade enzimática das enzimas pectinase, amilase e celulase, para ambos os processos.



**Figura 41:** Resultado do efeito do sequestrante nos processos 1 e 2 de biopreparação. Ensaio realizado a pH 6,5, T=65°C, tempo de reação de 40 min, RB: 1:10.

Segundo os testes realizados na caracterização das enzimas, a adição do sequestrante mostrou redução na atividade quando adicionado no início do processo. Para as enzimas celulase e pectinase a redução na atividade foi de 11% e para a amilase 9%, o tempo de ação do agente sequestrante foi de 40 min. Já com a adição após a reação enzimática, onde o tempo de atuação do sequestrante foi de 10 min, provocou uma queda menor, menos de 1% em relação ao processo sem adição do agente, indicando que neste período não há influência negativa na atividade enzimática.

Ao se comparar o uso dos dois processos, nota-se que houve uma diferença nos resultados de todos os ensaios (perda de massa, grau de branco, hidrofiliabilidade, pectina e amido removidos), conforme pode ser observado na Tabela 42.

**Tabela 42:** Efeito do agente sequestrante na biopreparação.

<b>Processo 1 - Biopreparação com sequestrante no início do processo</b>	<b>Processo 2 - Biopreparação com sequestrante após 40 min de processo</b>

<b>Perda de Massa (%)</b>	4,8 ± 0,5	5,6 ± 0,5
<b>Hidrofilidade (s)</b>	< 1	< 1
<b>Grau de Alvura (°Be)</b>	19,5 ± 1,5	23 ± 2,5
<b>Remoção Pectina (%)</b>	77	85
<b>Residual de Amido (%)</b>	0,14-0,20	0,10-0,14

\* pH 6,5, T=65°C, tempo total de reação de 40 min (processo 1), tempo total de reação de 50 min (processo 2), RB: 1:10.

A variação obtida indica que o uso do sequestrante é mais favorável após o tempo de reação enzimática (processo 2), promovendo um aumento no teor de pectina e amido removidos das fibras e conseqüentemente da perda de massa, além do aumento no branqueamento e absorção instantânea de água.

Visando a obtenção de melhores resultados sem aumentar o tempo de processo, foi realizado um ensaio de biopreparação com a adição do agente sequestrante após 30 min de reação enzimática, totalizando 40 min de processo (processo 3). O ensaio foi realizado nas mesmas condições dos processos 1 e 2, pH 6,5, T = 65°C e R.B. 1:10. A Tabela 43 apresenta os resultados do processo 3.

**Tabela 43:** Efeito do agente sequestrante após 30 min de reação enzimática.

<b>Processo 3 - Biopreparação com sequestrante após 30 min de processo</b>	
<b>Perda de Massa (%)</b>	5,3 ± 0,9
<b>Hidrofilidade (s)</b>	< 1
<b>Grau de Alvura (°Be)</b>	21 ± 2,2
<b>Remoção Pectina (%)</b>	81
<b>Residual de Amido (%)</b>	0,10-0,14

\* pH 6,5, T=65°C, tempo total de reação de 40 min (processo 3), RB: 1:10.

No entanto, o uso do processo 3 em relação ao 2 torna-se mais vantajoso por utilizar menor tempo de processo, pois ambos os

resultados são muito próximos e atendem os requisitos necessários para o processo de tingimento e acabamento posteriores.

#### 4.4. Resultados do Comportamento Tintorial

O rendimento de cor é dado pela capacidade de colorir de um corante e representado pela intensidade que o tingimento pode alcançar. Sua medida é dada em percentual de força colorística, obtido através de leitura espectrofotométrica, sempre relativa a um padrão de referência.

##### 4.4.1. Avaliação da Influência do Pré-tratamento no Rendimento do Tingimento

Na avaliação da interferência do rendimento dos corantes foram realizados tingimentos em tecidos alvejados e biopreparados utilizando as mesmas condições de processo e concentrações de corantes e auxiliares em ambos os testes. Os parâmetros do processo de preparação utilizados foram os apresentados nas Figuras 8 (1) para o tecido biopreparado e Figura 9 para o tecido alvejado. As concentrações de corantes e auxiliares estão apresentadas na Tabela 11.

A Tabela 44 apresenta os resultados das amostras resultantes dos diferentes processos de pré-tratamento.

**Tabela 44:** Resultados dos procedimentos experimentais para substratos alvejados e biopreparados.

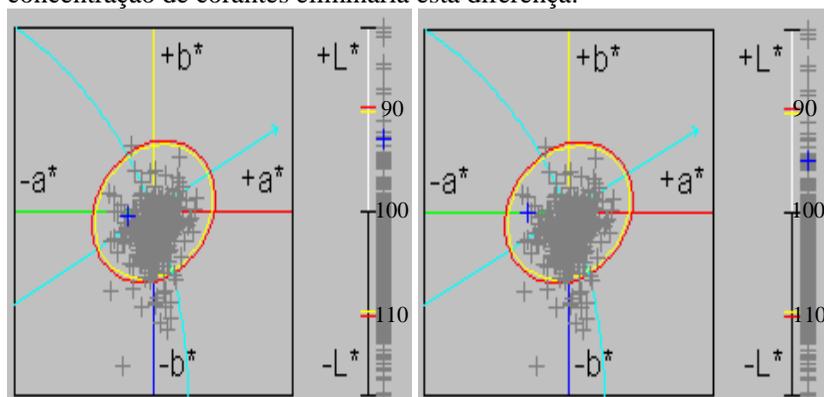
Amostra	Dados			
	a*	b*	L	$\Delta E$ (cmc)
<b>Tecido Alvejado</b>	3,71	2,00	93,28	0,75
<b>Tecido Biopreparado</b>	3,51	2,07	95,31	0,68

Através dos resultados apresentados na Tabela 44 foi verificado que houve uma pequena variação da cor para os tingimentos com os corantes em estudo, quando modificado o processo de preparação.

Conforme pode ser observado na Figura 43 na escala L (luminosidade), o tecido biopreparado apresentou menor luminosidade, 95,31% em relação ao tecido alvejado 93,28%. Dos três componentes usados para medir a diferença de cor ( $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$ ,  $\Delta b^*$ ), apenas  $\Delta L^*$  é representativo em termos do sinal da diferença:  $L^*_{amostra} - L^*_{padrão}$ , indicando que a amostra é mais clara se L é positivo e mais escura para valores negativos.

Dentre os valores de croma obtidos, não houve variação significativa, embora o mais relevante para a análise foi o croma  $b^*$  que possui uma relação direta com o grau de branco, que vai do  $-b^*$  ao  $+b^*$  (azul-amarelo), que indica o aspecto limpo (mais azulado) ou sujo (mais amarelado).

Estes valores estão coerentes, já que o tecido biopreparado está mais sujo devido à presença de ceras e pigmentos presentes na fibra,  $+b^* = 2,07$ , tornando o tingimento mais amarelado, enquanto o tecido alvejado encontra-se mais limpo,  $+b^* = 2,00$ , apresentando uma tonalidade mais azulada para a amostra tingida. Um pequeno ajuste na concentração de corantes eliminaria esta diferença.



**Tecido Alvejado**

**Tecido Biopreparado**

**Figura 42:** Força colorística dos tecidos alvejados e biopreparados.

A variação no resultado final da cor ( $\Delta E$ ) foi pequena e aceitável, para os padrões industriais. Assim, a única vantagem apresentada pelo processo de alvejamento é a eliminação completa dos “piolhos”, casquinhas de algodão, que eventualmente aparecem em cores mais claras quando se utiliza como preparação somente uma purga.

#### 4.4.2. Avaliação da Eficiência do Biopolimento e Tingimento na Presença da Celulase

Para avaliação da eficiência do biopolimento e tingimento na presença de uma celulase neutra foi realizado biopolimento antes e

simultaneamente ao processo de tingimento, nos tecidos alvejados e biopreparados.

Os parâmetros dos processos de biopolimento utilizados foram os apresentados nas Figuras 10 (1) e (2). As concentrações de enzima, corantes e auxiliares estão apresentadas na Tabela 11. A Tabela 45 apresenta os resultados dos testes resultantes dos diferentes processos de biopolimento.

**Tabela 45:** Resultados dos procedimentos experimentais para substratos alvejados e biopreparados com o processo de biopolimento.

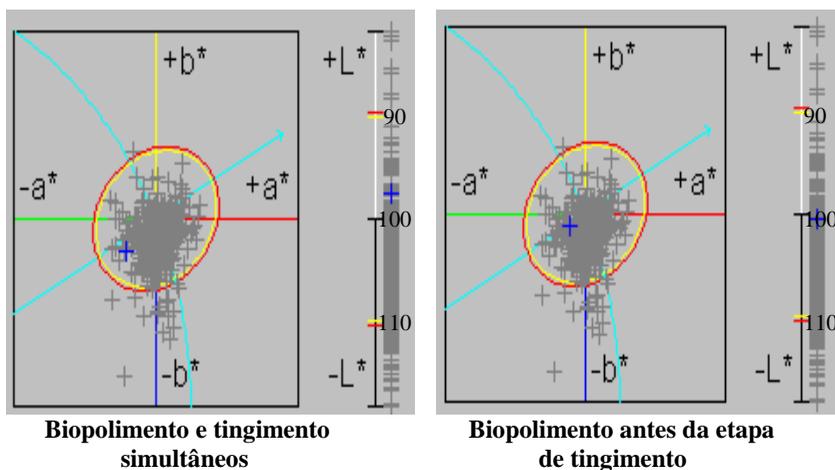
<b>Dados</b>					
<b>Amostra</b>	<b>Teste</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>	<b>L</b>	<b><math>\Delta E</math> (cmc)</b>
<b>Tecido Alvejado</b>	Padrão – Tingimento sem biopolimento	3,71	2,00	93,28	0,75
	Biopolimento e tingimento simultâneos	3,67	1,73	97,20	0,72
	Biopolimento antes do processo de tingimento	3,85	1,95	100,44	0,38
<b>Tecido Biopreparado</b>	Padrão – Tingimento sem biopolimento	3,51	2,07	95,31	0,68
	Biopolimento e tingimento simultâneos	3,45	2,09	96,30	0,74
	Biopolimento antes da etapa de tingimento	3,67	2,03	103,19	0,44

Nas Figuras 44 e 45 estão apresentados os gráficos referentes aos rendimentos tintoriais das avaliações que constam na Tabela 45.

Para o processo de biopolimento e tingimento simultâneos sobre o tecido alvejado, foi identificado que houve uma fixação de 97,20% do corante esgotado. Já para o processo de biopolimento realizado antes do tingimento houve praticamente a mesma fixação de corante, 100,44%. Estes valores comparados com o tingimento sem o processo de biopolimento (padrão 93,28%) mostram-se praticamente os mesmos em relação ao rendimento tintorial, havendo um aumento de 4 a 7% na fixação dos corantes, indicando que não há influência negativa da celulase sobre a montagem dos corantes na fibra celulósica para o tecido alvejado.

A amostra com biopolimento e tingimento simultâneos apresentou croma  $+b^* = 1,73$  e a amostra com biopolimento antes do

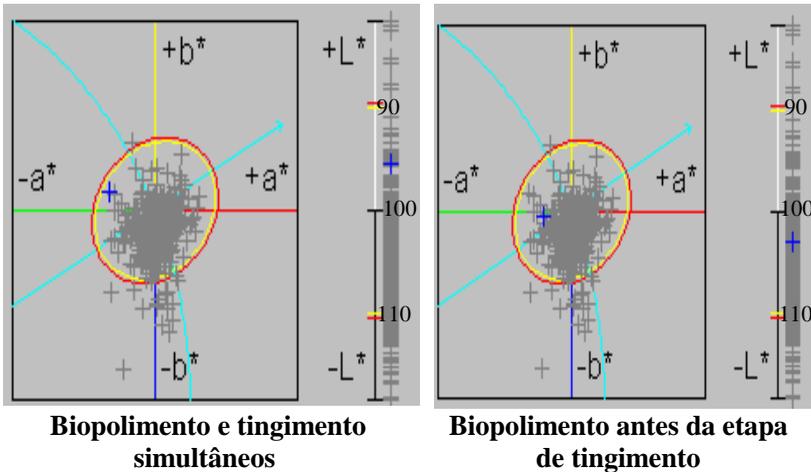
tingimento obteve  $+b^* = 1,95$ , ambos inferiores a amostra padrão ( $+b^* = 2,00$ ), direcionando para a cor azul que indica maior grau de branco do tecido, mostrando que o biopolimento auxilia na limpeza das fibras melhorando o acesso dos corantes.



**Figura 43:** Rendimento tintorial do tecido alvejado nos processos de biopolimento e biopolimento e tingimento simultâneos.

O processo de biopolimento e tingimento simultâneos para o tecido biopreparado fixou 96,30% do corante esgotado, obtendo uma diferença de 1% de fixação em relação ao padrão, ou seja, os valores são muito próximos com pouca influência sobre a montagem dos corantes.

Para o processo de biopolimento realizado antes do tingimento a fixação de corante foi de 103,19%, indicando um aumento em relação ao padrão de rendimento tintorial e ao processo simultâneo. No entanto, esta diferença não é significativa, já que os valores encontram-se dentro das tolerâncias ( $\pm 10\%$ ). Logo, para o tecido biopreparado também não foi verificada influência negativa da celulase sobre a montagem dos corantes na fibra celulósica. Os valores de croma não tiveram variação, ficando em  $+b^* = 2,09$  para o processo simultâneo,  $+b^* = 2,03$  para o biopolimento antes do tingimento e padrão  $+b^* = 2,07$ , porém em relação aos valores de  $+b^*$  dos ensaios no tecido alvejado houve uma variação, necessitando de um ajuste na receita de corantes para obtenção da mesma tonalidade.



**Figura 44:** Rendimento tintorial do tecido biopreparado nos processos de biopolimento e biopolimento e biopolimento e tingimento simultâneos.

Analisando-se as Figuras 43, 44 e 45, observa-se também uma tendência desta tricomia para a menor montagem do corante vermelho 194 (croma +a\*), deixando assim as amostras mais esverdeadas, mas ainda encontra-se dentro dos padrões definidos para cor analisada e o comportamento da amostra padrão (Figura 43) é o mesmo, isto indica que a presença da celulase não alterou a curva de montagem dos corantes. Estes dados são necessários para a formulação da receita de tingimento sobre o substrato biopreparado.

A variação no resultado final da cor ( $\Delta E$ ) encontra-se dentro dos padrões. Desta forma, conclui-se que a biopreparação com biopolimento e tingimento simultâneos mostram-se como uma boa alternativa, promovendo resultados tintoriais satisfatórios, possibilitando redução na concentração de corantes, economia de água (devido a redução no número de banhos), energia e tempo em relação ao processo convencional.

#### 4.5. Ensaios em Escala Piloto

Após a determinação das condições ideais do processo em escala laboratorial, o mesmo foi testado em uma máquina piloto de produção, cujo objetivo foi avaliar as características finais do produto têxtil assim como realizar uma análise econômica de todo o processo.

#### 4.5.1. Análise dos Resultados de Solidez da Cor, Pilling, Pilosidade e Hidrofilidade

Foram testados dois tipos de processo em escala piloto: (1) processo atual utilizado na empresa têxtil onde o trabalho foi desenvolvido, com preparação alcalina conforme apresentado na Figura 9, seguido do processo convencional de biopolimento e tingimento, como apresentado na Figura 10 (1); (2) novo processo, proposto e desenvolvido neste trabalho, que utiliza biopreparação conforme apresentado na Figura 8 (1), seguido do processo de biopolimento e tingimento simultâneos, como apresentado na Figura 10 (2).

Os testes de solidez da cor, *pilling*, pilosidade e hidrofilidade final foram realizados de acordo com os procedimentos experimentais descritos no item 3.2.2. A Tabela 46 apresenta os resultados dos ensaios *pilling*, pilosidade e hidrofilidade final. Os ensaios foram realizados em triplicata.

**Tabela 46:** Resultados de *pilling*, pilosidade e hidrofilidade final.

Tipo de Processo	<i>Pilling</i> (ASTM-D 3512)		Pilosidade (%)		Hidrofilidade (s)	
	Teste	Padrão	Teste	Padrão	Teste	Padrão
<b>Alcalino</b>	5	≥ 4	0,18	≤ 0,15	≤ 10	≤ 10
<b>Biopreparação</b>	5	≥ 4	0,13	≤ 0,15	≤ 10	≤ 10

De acordo com os resultados obtidos pode-se verificar que a nova proposta de processo atende aos padrões estabelecidos em todos os parâmetros estudados, destacando-se em relação aos ensaios de pilosidade, onde o percentual de pó obtido para o processo atual foi de 0,18 enquanto que para o processo novo a média ficou em torno de 0,13%. Em termos numéricos esta diferença não é significativa, no entanto em relação a aparência final do produto os resultados são muito superiores. A Figura 46 mostra a concentração de fibras que se desprendem da toalha após processo de lavagem.



**Figura 45:** Concentração de fibras que se desprendem da toalha após processo de lavação.

Uma hipótese para o menor percentual de pilosidade gerado deve-se ao processo de biopreparação ser menos agressivo às fibras de algodão, em relação ao processo convencional, além do biopolimento com celulase neutra ser menos agressivo (processo em condições brandas de pH) em relação ao biopolimento com celulase ácida (pH 4,5 com posterior adição de álcali para neutralização), fazendo com que menos fibras se desprendam do tecido gerando menor residual de pó.

A Tabela 47 apresenta os resultados dos ensaios de solidez da cor, as imagens dos testes estão relacionadas na Figura 47. Os ensaios foram realizados em triplicata.

**Tabela 47:** Resultados de solidez da cor à luz, fricção e lavagem.

Tipo de Processo	Solidez a Luz (NBR 12997)		Solidez a Fricção (ISO105-X12)				Solidez a Lavagem (ISO105-C04)	
	Teste	Padrão	Teste Seco	Padrão Seco	Teste Úmido	Padrão Úmido	Teste	Padrão
<b>Atual</b>	5	4	3/4	¾	4/5	4	4/5	3/4
<b>Proposta</b>	5	4	3/4	¾	4/5	4	4/5	3/4

Tipo de Processo	Solidez a Luz (NBR 12997)	Solidez a Fricção Seco (ISO105-X12)	Solidez a Fricção Úmido (ISO105-X12)	Solidez a Lavagem (ISO105-C04)
Atual				
Proposta				

**Figura 46:** Imagem dos testes de solidez da cor à luz, fricção e lavagem.

Analisando-se os resultados obtidos do novo processo, verifica-se que as notas de solidez luz, fricção e lavagem atenderam os padrões estabelecidos. Um ponto importante a salientar é que as condições de teste para a solidez à luz foram rigorosas tendo sido avaliado após 40 horas de exposição. A norma não especifica a quantidade de horas a serem avaliadas, mas tradicionalmente utiliza-se avaliação com 40 horas para tecidos felpudos, teste compatível com exigências internacionais. Desta forma, a nova proposta de processo é passível de aplicação na linha de produção têxtil.

#### 4.5.2. Análise Econômica dos Processos Estudados

Foi analisado nesta etapa o custo dos insumos que compõem o custo total do processo, como tempo de máquina, água, produtos químicos e enzimas utilizados no processo. O custo de energia não é contabilizado diretamente devido a falta de uma ferramenta específica, no entanto indiretamente este custo se reflete no tempo de processo, já que uma etapa que é realizada a 95°C e passa a ser feita a 60°C irá precisar de um tempo menor para atingir o patamar estipulado. Os custos foram realizados para uma máquina com capacidade de 330 kg de tecido e relação de banho 1:7.

O processo proposto (biopreparação + biopolimento e tingimento simultâneos) apresentou tempo total de 205 min, sendo 45 min na biopreparação, 60 min na etapa de biopolimento e tingimento simultâneos e 100 min para o processo de lavagem final. Para o processo convencional o tempo de processo foi de 255 min, utilizando 55 min para a etapa de alvejamento, 40 min para o biopolimento, 60 min para o tingimento e 100 min para o processo de lavagem final, resultando em uma diferença de 50 min. O custo por minuto da máquina é de R\$ 0,5256, resultando em um custo de R\$ 134,0 para o processo convencional e R\$ 108,0 para o novo processo enzimático. A Tabela 48 apresenta os valores de tempo e custo para ambos os processos analisados.

**Tabela 48:** Análise do tempo de processo.

Processo	Tempo de Processo	
	Tempo (min)	Custo (R\$)
<b>Convencional</b>	255	134,00
<b>Novo Processo</b>	205	108,00
<b>Diferença</b>	50	26,00

Toda a água utilizada no processo é contabilizada, o custo de 1 m<sup>3</sup> da água da estação de tratamento de água (ETA) é de R\$ 0,25, que é a água limpa utilizada para a fabricação do produto têxtil. Após seu descarte para a estação de tratamento de efluente (ETE) o custo para seu tratamento é de R\$ 2,35. O processo convencional utilizou 6 banhos, enquanto o novo processo utilizou apenas 3 banhos, gerando uma economia de 3 banhos. Considerando que o consumo de água utilizada pela máquina é de 2,3 m<sup>3</sup> cada banho, tem-se uma economia de R\$ 18,00/m<sup>3</sup> de água. A Tabela 49 apresenta a quantidade de água consumida e custo para os processos estudados.

**Tabela 49:** Análise da quantidade de água utilizada nos processos.

Processo	Número de banhos	Água	
		ETE + ETA (m <sup>3</sup> )	Custo (R\$)
<b>Convencional</b>	6	14,0	36,00
<b>Novo Processo</b>	3	7,0	18,00
<b>Diferença</b>	3	7,0	18,00

O custo com insumos químicos é composto pelas receitas de alveijamento, apresentada no item 3.5.2, biopreparação, apresentada no item 3.5.1 e receita de biopolimento e tingimento apresentada no item 3.5.3. Para a etapa de biopreparação o custo total da receita foi R\$ 32,00, para o alveijamento tradicional o custo foi de R\$ 37,00, isto se deve à alta concentração dos produtos químicos utilizados em relação ao uso de enzimas, e ao menor custo das enzimas aplicados hoje no mercado nacional. A receita de tingimento para o tecido biopreparado foi rematizada, pois o tecido encontra-se mais escuro necessitando de menos corantes em relação ao tecido alvejado. O custo dos insumos químicos encontra-se na Tabela 50.

**Tabela 50:** Custo dos insumos químicos para os processos estudados.

Processo	Custo dos Insumos Químicos (R\$)			
	Receita de Alveijamento	Receita de Biopreparação	Receita de Biopolimento + Tingimento	Total (R\$)
Convencional	37,00	-	1607,00	1644,00
Novo Processo	-	32,00	1600,00	1632,00
Diferença	-	-	-	12,00

A Tabela 51 apresenta um resumo de custos com todos os insumos, tempo, água e produtos químicos.

**Tabela 51:** Custo de 1 partida em máquina de capacidade de 330 kg de tecido comparando o processo convencional com o novo processo.

Processo	Tempo	Água	Químicos	Total (R\$)
	Custo (R\$)	Custo (R\$)	Custo (R\$)	
Convencional	134,00	36,00	1644,00	1814,00
Novo	108,00	18,00	1632,00	1758,00
Processo Diferença	26,00	18,00	12,00	56,00

O custo total de 1 partida em máquina de capacidade de 330 kg de tecido com o processo convencional é de R\$ 1814,00 e o custo do processo de biopreparação seguido de biopolimento e tingimento simultâneos é de R\$ 1758,00, gerando uma diferença de R\$ 56,00 por partida.

Para simularmos o ganho em capacidade produtiva considera-se uma produção trabalhando 24 hr por dia durante 25 dias, o tempo com o processo convencional é de 255 min gerando um total de 5,6 partidas/dia (141 partidas/mês), enquanto com o novo processo o tempo

total de 205 min tem-se 7 partidas/dia (175 partidas/mês), gerando um aumento de 24% de capacidade produtiva.

Desta forma conclui-se que o processo de biopreparação seguido de biopolimento e tingimento simultâneo, além de atender os requisitos de qualidade necessários para o processo de produção de artigos felpudos, é economicamente viável, gerando um ganho em capacidade produtiva de 24% e um custo de processo mais econômico, como pode ser observado na Tabela 51.

## CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

Neste capítulo está apresentada a síntese dos resultados deste estudo respondendo aos objetivos traçados inicialmente.

De acordo com o *pool enzimático* estudado, para a resposta atividade enzimática, os fatores principais analisados (pectinase, amilase e celulase) podem ser usados de forma combinada, observa-se que não existe queda da atividade enzimática, ou seja, uma enzima não interfere negativamente na atividade das outras.

Dentre as várias combinações estudadas, o ensaio que melhor atende aos requisitos perda de massa, grau de alvura, hidrofiliidade, remoção de substâncias pécnicas, menor residual de amido e custo de processo é o ensaio 12, com 66% pectinase, 17% amilase e 17% celulase.

Os corpos de prova resultantes da preparação alcalina apresentaram maior grau de alvura, entretanto, não é o objetivo deste trabalho alcançar o mesmo grau de alvura utilizado para tingimento de cores claras, e sim um grau de alvura suficiente para o tingimento de cores médias a escuras. Para a preparação alcalina obteve-se os seguintes resultados, 9,5% de perda de massa, hidrofiliidade menor que 1 s, 100% de remoção de substâncias pécnicas e residual de amido entre 0,20-0,30%. Os resultados de biopreparação apresentaram uma menor perda de massa, em torno de 5,1%, hidrofiliidade instantânea e a remoção de substâncias pécnicas e residual de amido 81% e 0,10-0,14, respectivamente.

As condições ideais para o processo de biopreparação com enzimas de forma combinada deve ser na temperatura de 65°C, pH 6,5 e tempo de reação de 40 minutos.

A presença do umectante não-iônico não afetou a atividade das enzimas, já com a adição do agente sequestrante houve uma redução de 9% na atividade da enzima amilase e 11% na atividade das enzimas pectinase e celulase. Entre os processos analisados o uso do agente sequestrante após o tempo de reação enzimática mostrou-se mais eficaz, melhorando o grau de alvura, tornado a hidrofiliidade instantânea e melhorando a remoção de substâncias pécnicas e amido.

Na avaliação da interferência do rendimento dos corantes em tecidos alvejados e biopreparados não houve variação significativa, assim, a única vantagem apresentada pelo processo de alvejamento é a eliminação completa dos “pioelhos”, casquinhas de algodão, que eventualmente aparecem em cores mais claras quando se utiliza como preparação somente uma purga. Na avaliação da interferência de uma celulase neutra no rendimento dos corantes não foi verificado influência

negativa da celulase sobre a montagem dos corantes na fibra celulósica, devido a pequena diferença nos valores de fixação dos corantes em relação ao padrão (tingimento sem biopolimento). Os corantes utilizados também não afetaram a atividade da celulase, visto que o processo de biopolimento obteve o valor máximo de eficiência na escala dos padrões fotográficos utilizados pela indústria têxtil.

Através dos ensaios realizados em máquina piloto de produção verificou-se que utilizando o processo proposto os resultados dos testes de solidez, *pilling* e pilosidade atenderam os padrões de qualidade exigidos pela indústria têxtil.

A viabilidade econômica do processo foi comprovada através de análises de custos e verificou-se a possibilidade de um aumento de 24% na capacidade produtiva da tinturaria onde efetuou-se o estudo.

Portanto, o *pool enzimático* composto pelas enzimas pectinase, amilase e celulase se mostrou com potencial para ser empregado em um processo de biopreparação industrial, e que sua utilização pode ser tão eficaz quanto o processo alcalino convencional. E que o processo de biopolimento e tingimento simultâneos, além de atender os requisitos de qualidade necessários apresenta ganho produtivo.

## **CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, sugere-se para o desenvolvimento de trabalhos futuros:

- Comprovar a redução da toxicidade do efluente da preparação enzimática em relação ao efluente da preparação alcalina, através de testes com bioindicadores;
- Avaliar a possibilidade de reuso do banho enzimático;
- Testar o biopolimento e tingimento simultâneos para outras classes de corantes.



## REFERÊNCIAS

ABRAHÃO NETO, J. Algumas aplicações de enzimas. *Biotecnologia industrial*. Processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Editora Edgard Blücher, v. 3, 2001.

ALMEIDA, C.; BRÁNYIK, T.; MORADAS-FERREIRA, P.; TEIXEIRA, J.; Use of two different carriers in a packed bed reactor for endopolygalacturonase production by a yeast strain. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1937-1942, 2005.

AGRAWAL, P.B.; NIERSTRASZ, V.A.; WARMOESKERKEN, M.M.C.G. Role of mechanical action in low-temperature cotton scouring with *F. solani pisi* cutinase and pectate lyase. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 42, p. 473–482, 2008.

AHLAWAT, S.; DHIMAN, S.S.; BATTAN, B.; MANDHAN, R.P.; SHARMA, J. Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 521–526, 2009.

ALY, A.S.; MOUSTAFA, A.B.; HEBEISH, A. Bio-technological treatment of cellulosic textiles. *Journal of Cleaner Production*, n. 12, p. 697-705, 2004.

ANDREAUS, J. A Aplicação de celulases em processos de envelhecimento: processo *stonewash*, descoloração. Seminário Internacional de Aplicação da Biotecnologia na Indústria Têxtil. *Proceedings/Anais*. Universidade Regional de Blumenau, Departamento de Química. 2001.

ASQUIERI, E.R.; FERNANDES, L.P.; MONTEIRO, V.N.; ULHOA, C.J. Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolin*. *Revista eletrônica de farmácia*, v. 1, p. 43-51, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13000**: Material têxtil – Determinação da hidrofiliidade de tecidos. Rio de Janeiro, 1993.

AXT-MARTINELLI, U. Processos de biopurga ambientalmente corretos. *Química Têxtil*, n. 66, mar. 2002. Trabalho originalmente

apresentado no Seminário Internacional de Aplicação de Biotecnologia na Indústria Têxtil, maio 2001, Blumenau, Santa Catarina, Brasil.

BERGER-SCHUNN, A. *Practical Color Measurement*, Wiley, New York, 1994.

BERNFELD, P. Amylase a and b. *Methods Enzymol*, v. 1, p.149 - 51, 1955.

BERNS, R.S.; BILMAYER; SALTZMAN'S. *Principles of color technology*, 3 ed. New York: John Wiley & Sons, 2000.

BRADFORD, M.M.A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p.248-254, 1976.

BUSCHLE-DILLER, G.; ZERONIAN, S.H.; PAN, N.; YOON, M.Y. Enzimatic hidrólisis of cotton, linen, ramie, and viscose rayon fabrics. *Textile Research Journal*, v. 64, n. 5, p. 270-279, 1994.

BUSCHLE-DILLER, G.; TRAORE, M.K. Influence of direct and reactive dyes on the enzymatic hydrolysis of cotton. *Textile Research Journal*, v. 68, p.185 - 192, 1998.

CAVACO-PAULO, A. Mechanism of cellulase action in textile process. *Carbohydrate Polymers*, v. 37, p. 273-277, 1998.

CHAMPAGNE, P.P.; NESHEIM, M.E.; RAMSAY, J.A. Effect of a non-ionic surfactant, Merspol, on dye decolorization of Reactive blue 19 by laccase. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, p. 147-152, 2010.

CHANZY, H.; HENRISSAT, B. Undirection degradation of Valonia cellulose microcrystals subjected to cellulase action. *FEBS Lett.*, n. 184, p. 285-288, 1985.

COLLMER, A.; KEEN, N.T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, v. 24, p. 383-409, 1986.

- CSISZÁR, E.; LOSONCZI, A.; SZAKÁCS, G.; RUSZNÁK, I.; BEZÚR, L.; REICHER, J. Enzymes and chelating agent in cotton pretreatment. *Journal of Biotechnology*, v. 89, p. 271-279, 2001.
- CUNHA, R.T.; PEREIRA JR.,N.; ANDRADE, C.M.M.C. Aplicação de enzimas em processos industriais têxteis. *XIX CNTT e 6ª FENATÊXTIL*, Fortaleza, 2000.
- DA-SILVA, R.; FRANCO, C.M.L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. *Boletim SBCTA*, v. 31, n. 2, p. 249-260, 1997.
- DHIMAN S.S; SHARMA J.; BATTAN B. Pretreatment processing of fabric by alkalothermophilic xylanase from *Bacillus stearothermophilus* SDX. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 43, p. 262-9, 2008.
- DOVI, V.G.; FRIEDLER, F.; HUISINGH, D.; KLEME, J.J. Cleaner energy for sustainable future. *Journal of Cleaner Production*, v. 17, p. 889-895, 2009.
- DYK, J.S.; SAKKA, M.; SAKKA, K.; PLETSCHEKE, B. Identification of endoglucanases, xylanases, pectinases and mannanases in the multi-enzyme complex of *Bacillus licheniformis* SVD1. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 47, p. 112-118, 2010.
- FAVERI, D.; ALIAKBARIAN, B.; AVOGADRO, M.; PEREGO, P.; CONVERTI, A. Improvement of olive oil phenolics content by means of enzyme formulations: Effect of different enzyme activities and levels. *Biochemical Engineering Journal*, v. 41, p. 149-156, 2008.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 45, p. 405-418, 2009.
- FREITAS, K.R. Estabilização enzimática para aplicação em biopurga de tecidos de malhas de algodão. *Tese de Doutorado*. Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.
- GERHARTZ, W. *Enzyme in Industry*. Production and Applications edited by Wolfgang Ahle, second edition, 2004.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure Applied Chemical*, n. 59, p. 257-268, 1987.

GONZÁLES, C.F.; FARINA, J.I.; FIGUEROA, L.I.C. Optimized amylolytic enzymes production in *Saccharomycopsis fibuligera* DSM-70554. An approach to efficient cassava starch utilization. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 42, p. 272-277, 2008.

GOUVEIA, I.C.; FIADEIRO, J.M.; QUEIROZ, J.A. Enzymatic removal of plant residues from wool: Application of experimental design techniques for optimization parameters. *Biochemical Engineering Journal*, v. 41, p.157-165, 2008.

GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B. Corantes Têxteis. *Revista Química Nova*, v. 23, n. 1, p. 71-78, 2000.

GUBITZ, G. M. An introduction to biotechnology and enzymology related to applications in the textile industry. Seminário Internacional Aplicação da Biotecnologia na Indústria Têxtil. *Proceedings/Anais*. Universidade Regional de Blumenau, Departamento de Química. 2001.

GUBITZ, G.M. Uma introdução à biotecnologia e à enzimologia e suas aplicações na indústria têxtil. *Química Têxtil*, n. 73, 2003.

GUILLEN, J.G.; GARRIDO, J.M. *Algodon y Celulosa, Estructura y Propiedades*, Terrassa, Universidade Politècnica de Barcelona, 1987.

GUMMADI, S.N.; KUMAR, D.S. Optimization of chemical and physical parameters affecting the activity of pectin lyase and pectate lyase from *Debaryomyces nepalensis*: A statistical approach. *Biochemical Engineering Journal*, v. 30, p. 130-137, 2006.

GUSAKOV, A.V.; SINITSYN, A.P.; MARKOV, A.V.; SINITSYNA, O.A.; ANKUDIMOVA, N.V.; BERLIN, A.G. Study of protein adsorption on indigo particles confirms the existence of enzyme–indigo interaction sites in cellulose molecules. *Journal of Biotechnology*, v. 87, p. 83-90, 2001.

HEBEISH, A.; HASHEM, M.; SHAKER, N.; RAMADAN, M.; EL-SADEK, B. New development for combined bioscouring and bleaching

of cotton-based fabrics. *Carbohydrate Polymers*, v. 78, p. 961-972, 2009.

HEIKINHEIMO, L.; BUCHERT, J.; MIETTINEN-OINONEN, A.; SUOMINEN, P. Treating denim fabrics with *Trichoderma reesei* cellulases. *Textile Research Journal*, v. 70, n. 11, p. 969-973, 2000.

HEIKINHEIMO, L. *Trichoderma reesei* cellulases in processing of cotton. Tese de Doutorado. VTT Publications 483, Espoo, Finlândia, 2002.

HOONDAL, G.S.; TIWARI, R.P.; TEWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG, Q.K. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, p. 409-418, 2002.

JIANG, W.; YUAN, Z.; BI, J.; SUN, L. Conserving water by optimizing production schedules in the dyeing industry. *Journal of Cleaner Production*, v. 18, p. 1696-1702, 2010.

KALANTZI, S.; MAMMA, D.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D. Effect of pectate lyase bioscouring on physical, chemical and low-stress mechanical properties of cotton fabrics. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 8185-8192, 2008.

KARAPINAR, E., SARIISIK, M. O. Scouring of cotton with cellulases, pectinases and proteases. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, v. 12, n. 3 (47), p. 79-82, 2004.

KASHYAP, D.R.; VOHRA, P.K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, n.77, p. 215-227, 2001.

KAUR, G.; KUMAR, S.; SATYANARAYAMA, T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. *Bioresource Technology*, v. 94, 239-243, 2004.

KIM, B.; LEE, B.; LEE, Y.; JIN, I.; CHUNG, C.; LEE, J. Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine

bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 44, p.411-416, 2009.

KIRK, O.; BORCHET, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, n. 13, p. 345-351, 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, n. 227, p. 680-5, 1970.

LENTING, H.B.M.; ZWIER, E.; NIERSTRASZ, V.A. Identifying important parameters for a continuous bioscouring process. *Textile Research Journal*, v. 72, n. 9, p. 825-831, 2002.

LI, Y.; HARDIN, I.R. Enzyme scouring of cotton – surfactants, agitation and selection of enzymes. *Textile Chemist and Colorist*, n. 30 (9), p. 23-29, 1998.

LIMA, A.S.; ALEGRE, R.M.; MEIRELLES, A.J.A. Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. *Carbohydrate Polymers*, v. 50, p. 63-68, 2002.

LIN, C.H.; HSIEH, Y.L. Direct scouring of greige cotton fabrics with proteases. *Textile Research Journal*, v. 71, n. 5, p. 425-434, 2001.

LIPP-SYMONOWICZ, B.; TANSKA, B.; WOLUKANIS, A.; WRZOSEK, H. Influence of enzymatic treatment on the flax fibre morphological structure, physico-chemical properties and metrological parameters of yarn. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, v. 12, n. 1 (45), p. 61-65, january/march 2004.

MALUF, E.; KOLBE, W. *Dados técnicos para a indústria*. 2º ed. Revista e ampliada. IPT: ABIT, São Paulo, 2003.

MANSUR, L.R. Utilização de soro de leite para a produção de amilases por *bacillus* sp. smia-2. Tese de mestre em produção vegetal, Universidade estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2006.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MURAKAMI, S.; NAGASAKI, K.; NISHIMOTO, H.; SHIGEMATU, R.; UMESAKI, J.; TAKENAKA, S.; KAULPIBOON, J.; PROUSOONTORN, M.; LIMPASENI, T.; PONGSAWASDI, P.; AOKI, K. Purification and characterization of five alkaline, thermotolerant, and maltotetraose-producing  $\alpha$ -amylases from *Bacillus halodurans* MS-2-5, and production of recombinant enzymes in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 43, p. 321-328, 2008.

MURASHIMA, K.; NISHIMURA, T.; NAKAMURA, Y.; KOGA, J.; MORIYA, T.; SUMIDA, N.; YAGUCHI, T.; KONO, T. Purification and characterization of new endo-1,4-D-glucanases from *Rhizopus oryza*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, p. 319-326, 2002.

NEVELL, T.P.; ZERONIAN, S.H. *Cellulose Chemistry and Its Applications*, Ed. Nevell e Zeronian, John Wiley & Sons, n. 1, p. 15-29, 1985.

ÖNER, E.; SAHINBASKAN, B.Y. A new process of combined pretreatment and dyeing: REST. *Journal of Cleaner Production*, v. 19, p. 1668-1675, 2011.

PERE, J.; PUOLAKKA, A.; NOUSIAINEN, P.; BUCHERT, J. Action of purified *Trichoderma reesei* cellulases on cotton fibers and yarn. *Journal of Biotechnology*, v. 89, p. 247-255, 2001.

PIMENTEL, A. Caracterização de uma pectinase comercial e sua utilização no processo de purga da indústria têxtil. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

RICARDO, C.P.; TEIXEIRA, A. *Enzimas*, Editora Didática, 1976.

SANGWATANAROJ, U.; CHOONUKULPONG, K.; UEDA, M. Cotton scouring with pectinase and lipase/protease/cellulase. *AATCC Review*, v. 5, p. 17-20, 2003.

SAWADA, K.; UEDA, M. Enzyme processing of textiles in reverse micellar solution. *Journal of Biotechnology*, v. 89, p. 263-269, 2001.

- SILVA, E.G.; BORGES, M.F.; MEDINA, C.; PICCOLI, R.H.; SCHWAN, R.F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Res.*, n. 5, p. 859, 2005.
- SHAFIE, A.E.; FOUHA, M.M.G.; HASHEM, M. One-step process for bio-scoured and peracetic acid bleaching of cotton fabric. *Carbohydrate Polymers*, v. 78, p. 302-308, 2009.
- SHAFIEL, M.; ZIAEE, A.; AMOOZEGAR, M.A. Purification and biochemical characterization of a novel SDS and surfactant stable, raw starch digesting, and halophilic  $\alpha$ -amylase from a moderately halophilic bacterium, *Nesterenkonia* sp. strain F. *Process Biochemistry*, 2010.
- SOUZA, C.R.L.; PERALTA-ZAMORA P. Degradação de corantes reativos pelo sistema ferro metálico/peróxido de hidrogênio. *Química Nova*, v. 28, n. 2, p. 226-228, 2005.
- SPIER, M.R. *Produção de enzimas amilolíticas fúngicas  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido*. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de alimentos, Universidade Federal do Paraná, 2005.
- TROTMAN, E.R. *Dyeing and chemical technology of textile fibres*. Charles Griffin & Company Ltda. 6 ed., 1984.
- TROTMAN, E.R. *Textile Scouring and Bleaching*, 1sted, Textile Book Service, 1968.
- VANHANEN, M.; TUOMI, T.; TIIKKAINEN, U.; TUPASELA, O.; VOUTILAINEN, R.; NORDMAN, H. Risk of enzyme allergy in the detergent industry. *Occup. Environ. Med.*, v. 57, p. 121-125, 2000.
- VRSANSKÁ, M.; BIELY, P. The cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* QM 9414: action and cello-oligosaccharides. *Carbohydr. Res.*, v. 227, p. 19-27, 1993.
- WANG, X.Y.; SAWADA, K.; TOKINO, S.; UEDA, M. Bioscouring of cotton with pectinase enzyme. *J. Sc. Dyers Colour*, n. 11, v. 114, p. 333 – 336, 1998.

WANG C.; HSIEH Y.; NG C.; CHAN H.; LIN H.; TZENG W.; SHYU Y. Purification and characterization of a novel halostable cellulase from *Salinivibrio sp.* strain NTU-05. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 44, p. 373 – 379, 2009.

YADAV, S.; YADAV, P.K.; YADAV, D.; YADAV, K.D.S. Pectin lyase: A review. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 1-10, 2009.

YINGLING, G.L. Safe handling of enzymes. *Textile Chemist and Colorist & American Dyestuff Reporter*, v. 32 (1), p. 26-27, 2000.

YOUNG, R. A.; ROWELL, R. M. *Cellulose – Structure, modification and hidrolysis*. John Willey & Sons, 1986.

XIE, K.; CHENG, F.; ZHAO, W.; XU, L. Micelle dyeing with low liquor ratio for reactive dyes using dialkyl maleic acid ester surfactants. *Journal of Cleaner Production*, v.19, p. 332-336, 2011