

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTABILIZAÇÃO ENZIMÁTICA PARA APLICAÇÃO EM BIOPURGA
DE TECIDOS DE MALHAS DE ALGODÃO**

Tese submetida à Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química

Orientador: Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza - UFSC
Co-orientadora: Dr^a. Marta Cristina Teixeira Duarte - CPQBA- UNICAMP
Co-orientadora: Dr^a. Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza - UFSC

Kátya Regina de Freitas

Florianópolis/SC
Março de 2009

**ESTABILIZAÇÃO ENZIMÁTICA PARA APLICAÇÃO EM BIOPURGA
DE TECIDOS DE MALHAS DE ALGODÃO**

KÁTYA REGINA DE FREITAS

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 grau de Doutor em Engenharia Química.

Antônio Augusto Ulson de Souza, D. Sc.
Orientador, EQA, UFSC

Marta Cristina Teixeira Duarte, D. Sc.
Co-orientadora, CPQBA, UNICAMP

Selene M. A. Guelli Ulson de Souza, D. Sc.
Co-orientadora, EQA, UFSC

Leonel Teixeira Pinto
Coordenador do CPGENQ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza (EQA, UFSC)
Presidente

Prof. Dr^a. Selene M. A. Guelli Ulson de Souza (EQA, UFSC)

Prof. Dr^a. Regina Vasconcellos Antonio (CCB, UFSC)

Prof. Dr. Lorena Benathar Ballod (DEQ, FURB)

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior (EQA, UFSC)

Prof. Dr^a. Gisela Maria Zanin (DEQ, UEM)

Dedico
à minha adorável mãe, Sonia.

AGRADECIMENTOS

- Ao professor *Antônio Augusto Ulson de Souza*, pelas críticas, sugestões e orientação deste trabalho.
- À professora *Selene M. A. G. Ulson de Souza*, pela co-orientação deste trabalho.
- À amável professora *Marta C. T. Duarte* pela co-orientação e agradável disponibilidade.
- À professora *Regina Vasconcellos Antonio, Maria Risoleta Freire Marques e Fátima Regina Mena Barreto Silva* pelos esclarecimentos e informações.
- Aos admiráveis colegas dos laboratórios INTELAB, LABSIN/LABMASSA e LTE pela companhia, troca de ideias e de fantásticas lições de vida.
- À *Andréia de Souza, Andressa Vasquez, Cláudia Maté, Cristine Mallman, Davi Hoffman, Elaine Vosniak Takeshita, Eliane Forgiarini, Estela Feretti, Fabiane Binsfeld, Fernanda Batista, Fernanda Ferreira, Franciele Furlan, Heloisa Brandão, Jilly Anne de Souza, Julieta Furtado, Lilian Bortuluzzi, Lorena M. N. Cerutti, Luciane Juliano, Marcelo Anami, Mauricio Ferreira da Rosa, Rafael Benedet, Renata Pértile, Samir Besen, Solange Natalia Seibert, Tânia Espíndola e Viviane da Silva Lobo* pela maravilhosa confraria, na qual pude conviver com demonstração diária de dedicação na busca da realização, solidariedade, respeito, bom humor, parceria, exemplo e disciplina. Obrigada pelo fantástico aprendizado que me proporcionaram! Por tudo isso: “... *eu tenho tanto pra lhe falar, mas com palavras não sei dizer como é grande o meu amor por você (s)!*”
- Ao *Ildemar Mayer* pelo profissionalismo, amizade, companheirismo, incentivo, paciência, momentos felizes e principalmente bom humor.
- À CAPES, pelo apoio financeiro e ao projeto INOTEXTIL/FINEP com participação das empresas BUETTNER, COTEMINAS, MALHARIA BRANDILI e TAPAJÓS.
- Ao SENAI – CETEX – Blumenau pela possibilidade do desenvolvimento de alguns experimentos em suas dependências e pela disponibilidade, pronto atendimento e troca de informações.
- À Clariant pela doação dos agentes tensoativos.
- À Novozymes pela doação da enzima Pulpzyme HC utilizada como padrão de estabilidade.
- Ao secretário da pós-graduação, Edevilson, pela amizade e disponibilidade.
- A todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, pouco ou muito, para a realização deste trabalho.

OBRIGADA!

RESUMO

As condições severas do processo de purga empregado tradicionalmente em fibras celulósicas ocasionam um ataque generalizado, especificamente em tecidos 100% algodão, resultando em elevada perda de massa e diminuição da resistência das fibras. A substituição do processo de purga alcalina pela enzimática, além de permitir menor agressão química às fibras, devido à elevada especificidade das enzimas às substâncias que necessitam serem removidas como gorduras, proteínas, entre outras. Também possibilitam produtos acabados com melhores características de toque e resistência. Muitas enzimas já foram testadas para a remoção das substâncias hidrofóbicas das fibras, entretanto poucos são os estudos para a remoção dos fragmentos das cascas do capulho e gravetos presentes nas malhas produzidos por fios de algodão cardado. Neste trabalho foram avaliados a termoestabilidade do caldo bruto centrifugado de *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 e a influência da interação entre a enzima e substâncias químicas frequentemente utilizadas no processamento têxtil tais como os agentes tensoativos, ácidos e bases utilizados para a correção de pH, a adição de polióis para a estabilização enzimática e também o efeito de inibição ou ativação da atividade enzimática na presença de íons que comporiam as fibras de algodão. Utilizou-se como parâmetro de comparação à preparação comercial Pulpzyme HC (Novozymes), que possui o mesmo tipo de atividade de endoxilase. Os efeitos inibitórios decorrentes dos íons presentes na fibra de algodão poderiam impossibilitar a utilização da purga enzimática de substratos têxteis, especificamente malha de fio cardado 100% algodão. Dentre os reagentes testados, o KCl, NaCl and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ promoveram aumento na atividade quando utilizados na concentração de 5,0 mM. Dentre as diversas condições testadas constatou-se que o sorbitol 1,0 M, em tampão glicina-NaOH 0,01 M, com 5,0 g/L de umectante e 37,5 minutos de incubação são condições capazes de manter 62,94% da atividade inicial da enzima, e que o emulsificante não tem efeito significativo sobre a atividade da enzima. O agente umectante apresentou efeito significativo, provavelmente por ser composto por álcoois alifáticos. Os resultados da biopurga com xilanase mostraram que a enzima não apresentou o efeito desejado como agente de biopurga, considerando-se os padrões de qualidade exigidos pela indústria.

Palavras-chave: biopurga, purga enzimática, xilanase, algodão, indústria têxtil, estabilizante, poliol.

ABSTRACT

The harsh conditions of the scouring process traditionally employed in this type of cellulose fibres especially 100% cotton fabrics cause an attack generalized, promoting high loss of mass and decreased resistance of fiber. The replacement of the alkaline scouring process by the enzymatic provide a less aggression to the chemical fibers due to the high specificity of the enzymes to substances that need to be removed, such as fats, proteins, etc. Also enable finished products with better characteristics of touch and resistance. Many enzymes have been tested for the removal of substances hydrophobic fibres, but there are few studies for the removal of seedcoats present in the fabric produced by carded cotton. In this work were evaluated the thermostability of crude broth xylanase of *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 and the influence of the interaction between the enzyme and chemicals ions frequently used in textile processing like surfactants, acids and bases. It was tested the addition of polyols to stabilize enzymes and also the effect of inhibition or activation of enzyme activity in the presence of ions that compose the cotton fibers. The commercial preparation comparison Pulpzyme HC (Novozymes), that possesss type of activity the same from endoxylanase. Among the reagents tested, the KCl, NaCl and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ promoted increased activity when used at a concentration of 5.0 mM. Among the numerous conditions tested it was found that the sorbitol 1.0 M in glycine-NaOH buffer with 5.0 g/L and 37.5 minutes of incubation time were conditions to maintain 62.94% of the initial activity of the enzyme, and the emulsifying has no significant effect on the activity of the enzyme. The wetting agent presented significant effect probably because it is composed of aliphatic alcohols. From the stabilization of the enzyme in the operational conditions were carried out bioscouring. The combinations results used for the chemical agents had indicated that the emulsifying presented no effect on the activity of the enzyme and that the umectant agent shows significant effect, probably to be composed of aliphatic alcohols. After stabilization were reproduced numerous operational conditions that could be used in the textile process. The results of the combinations used for the chemical agents had indicated that the emulsifying presented no effect on the activity of the enzyme and that the agent umectante presents significant effect, probably to be composed of aliphatic alcohols. From the stabilization of the enzyme in the operational conditions were carried out bioscouring.

Keywords: bioscouring, biotreatment, xylanase, cotton, cotton fiber, stability, polyol.

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	– Comparação entre os processos enzimático e alcalino realizados em um equipamento de tingimento a jato	10
Tabela 2.2	– Componentes de celulase de fungos aeróbios e seu modo de ação na cadeia celulósica	14
Tabela 2.3	– Atividades relativas de celulases de <i>Trichoderma koningi</i> sobre a hidrólise completa de celulose de algodão	17
Tabela 2.4	Efeito dos íons e agentes químicos sobre a atividade enzimática do caldo bruto centrifugado	31
Tabela 2.5	Tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da β -xilanase de diferentes linhagens de <i>T. lanuginosus</i> em diferentes valores de pH	33
Tabela 3.1	– Características das enzimas utilizadas no trabalho	37
Tabela 3.2	– Características dos produtos químicos utilizados nos processos de purga convencional e enzimática	38
Tabela 3.3	– Níveis dos parâmetros usados para a determinação da melhor combinação tipo de solução tampão/estabilizante sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado	47
Tabela 3.4	– Planejamento fatorial 2^4 , com duas replicatas, para a determinação da melhor combinação tipo de solução tampão/estabilizante sobre a atividade remanescente (%) para o caldo bruto centrifugado	47
Tabela 3.5	– Níveis dos parâmetros estudados para avaliar a influência dos agentes tensoativos sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	48
Tabela 3.6	– Planejamento experimental 3^3 utilizado para avaliar a influência dos agentes tensoativos sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0 ..	48
Tabela 3.7	– Níveis dos parâmetros estudados na determinação das condições ótimas sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado para aplicação na biopurga – caso 1 e 2	49
Tabela 3.8	– Planejamento no planejamento fatorial completo de 4 fatores, misto	

	de 2 e 3 níveis, utilizado para determinar as condições ótimas de sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado para aplicação na biopurga	49
Tabela 3.9	– Procedimento (receita) utilizado na biopurga de tecidos em malha 100% algodão, pH 9,0, RB 1:10, 7 esferas de aço inox e agitação de 40 rpm	52
Tabela 3.10	– Procedimento (receita) utilizado para purga alcalina de tecidos em malha 100% algodão, RB=1:10	53
Tabela 4.1	– Propriedades das xilanases presentes no caldo bruto centrifugado de <i>Bacillus pumilus</i> CBMAI 0008 e na preparação enzimática Pulpzyme HC	55
Tabela 4.2	– Atividade xilanolítica remanescente (%) em função do tempo de incubação, para o caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	59
Tabela 4.3	– Atividade xilanolítica remanescente (%) em função do tempo de incubação, para a preparação enzimática Pulpzyme HC em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	60
Tabela 4.4	– Parâmetros da equação de Arrhenius para o caldo bruto centrifugado em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 8,0, e glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	63
Tabela 4.5	– Parâmetros da equação de Arrhenius para a preparação enzimática Pulpzyme HC em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 8,0, e glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	63
Tabela 4.6	– Constante de desativação térmica e tempo de meia-vida do caldo bruto centrifugado, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0 .	65
Tabela 4.7	– Constante de desativação térmica e tempo de meia-vida da preparação enzimática Pulpzyme HC, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	65
Tabela 4.8	– Resposta obtida no planejamento fatorial 2^4 , com duas replicatas, para a determinação da melhor combinação tipo de solução tampão/estabilizante sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado	67
Tabela 4.9	– Estatística descritiva da melhor combinação entre tipo de solução	

	tampão e tipo de estabilizantes sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado	68
Tabela 4.10	– ANOVA da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em função da combinação entre tipo de solução tampão e estabilizantes	69
Tabela 4.11	– Teste de Tukey aplicado às médias do tipo de tampão utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado	69
Tabela 4.12	– Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos do tipo de tampão utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado	70
Tabela 4.13	– Teste de Tukey aplicado às médias do tipo de estabilizantes utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado	71
Tabela 4.14	– Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos do tipo de estabilizante utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado	71
Tabela 4.15	– Teste de Tukey aplicado às médias dos fatores tipo de tampão e de estabilizante utilizados sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado	75
Tabela 4.16	– Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos do tipo de estabilizante utilizados sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado	76
Tabela 4.17	– Resposta obtida no planejamento fatorial completo 4 fatores, misto de 2 e 3 níveis, para determinar a melhor concentração do estabilizante sorbitol, 0,5 e 1,0 M, para o caldo bruto centrifugado, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	78
Tabela 4.18	– Estatística descritiva da melhor combinação de umectante, tipo de agitação, tempo de incubação e concentração do estabilizante sorbitol (0,5 e 1,0 M) para o caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	79
Tabela 4.19	– Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos do umectante utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0 ..	80
Tabela 4.20	– Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos da	

	concentração de sorbitol utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	81
Tabela 4.21	– Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos do tipo de agitação utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	81
Tabela 4.22	– Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos do tempo utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	81
Tabela 4.23	– ANOVA da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em função da combinação para combinação de todos os efeitos em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	86
Tabela 4.24	– Teste de Tukey aplicado às médias da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado para os tratamentos, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	89
Tabela 4.25	– Resposta do planejamento fatorial completo 4 fatores, misto de 2 e 3 níveis, utilizado para determinar a melhor concentração do estabilizante sorbitol, 1,0 ou 2,0 M, para o caldo bruto centrifugado, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	92
Tabela 4.26	– Estatística descritiva da melhor combinação de umectante, tipo de agitação, tempo de incubação e concentração do estabilizante sorbitol (1,0 ou 2,0 M) sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	95
Tabela 4.27	– Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos do tempo utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	95
Tabela 4.28	– Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos da concentração de sorbitol utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	95
Tabela 4.29	– Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos do tipo de agitação utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	96

Tabela 4.30	– Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos do umectante utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0 ..	96
Tabela 4.31	– ANOVA da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado para combinação de todos os efeitos em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	103
Tabela 4.32	– Teste de significância do modelo para atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	105
Tabela 4.33	– Teste de significância do modelo da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, após retirada dos efeitos não significativos	105
Tabela 4.34	– Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos de todos os parâmetros utilizados sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0 ..	107
Tabela 4.35	– Teste de Levene para homogeneidade de variâncias	109
Tabela 4.36	– Estatística descritiva da influência dos aditivos sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	110
Tabela 4.37	– Resposta do planejamento experimental 3^3 utilizado para avaliar a influência dos agentes tensoativos sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	111
Tabela 4.38	– Estatística descritiva da influência dos agentes tensoativos sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	112
Tabela 4.39	– ANOVA da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em função dos agentes tensoativos em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	113
Tabela 4.40	– ANOVA da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em função dos agentes tensoativos em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, após excluir os termos não significantes	114
Tabela 4.41	– Coeficientes estimados no modelo empírico para atividade	

	remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, depois da exclusão dos termos não significantes	114
Tabela 4.42	Coeficientes estimados no modelo de regressão para atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, depois da exclusão dos termos não significantes	114
Tabela 4.43	– Resposta predita de cada efeito no modelo para atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	115
Tabela 4.44	– Respostas preditas para cada nível de cada fator mantendo todos os outros fatores constante	116
Tabela 4.45	– Valores preditos para a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado	120
Tabela 4.46	– Efeito da inibição do carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,0, sobre a atividade enzimática do caldo bruto centrifugado	121
Tabela 4.47	– Média de hidrofiliidade para os tipos de purga estudados	123
Tabela 4.48	– Hidrofiliidade conferida aos corpos de prova conforme o tipo de processo	127
Tabela 4.49	– Grau de alvura e coordenadas de cor conferida aos corpos de prova conforme o tipo de processo	128
Tabela 4.50	– Perda de massa (%) conferida aos corpos de prova conforme o tipo de processo	130
Tabela 4.51	– Resumo dos parâmetros da estabilidade térmica	132

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	– Enzimas usadas nas várias etapas do processamento a úmido têxtil e no processamento do Denim	11
Figura 2.2	– Atuação das enzimas multicomponentes da celulase na estrutura da celulose	15
Figura 2.3	– Atuação da endo- β -1,4-xilanase na xilana	18
Figura 3.1	– Processo de biopurga com umectação inicial, antes da etapa enzimática	52
Figura 3.2	– Processo de biopurga <i>all in</i>	53
Figura 3.3	– Perfil do processo de purga alcalina	54
Figura 4.1	– Eletroforese SDS-PAGE do (1) caldo bruto centrifugado de xilanase de <i>Bacillus pumilus</i> CBMAI 0008 e (2) Pulpzyme HC revelado com corante <i>comassie brilliant blue R-250</i>	56
Figura 4.2	– Atividade enzimática xilanolítica em função da temperatura do caldo bruto centrifugado, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 8,0, e glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	57
Figura 4.3	– Atividade enzimática xilanolítica em função da temperatura da preparação enzimática Pulpzyme HC em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 8,0, e glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	57
Figura 4.4	– Atividade xilanolítica remanescente (%) para o caldo bruto centrifugado, durante 150 minutos no intervalo de temperatura de 40-90°C, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	60
Figura 4.5	– Atividade xilanolítica remanescente (%) para a preparação enzimática Pulpzyme HC, durante 150 minutos no intervalo de temperatura de 40-90°C, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	61
Figura 4.6	– Efeito do tipo de tampão sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado	70
Figura 4.7	– Efeito do tipo de estabilizante sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado	72
Figura 4.8	– Efeito do estabilizante conforme o tipo de tampão utilizado sobre a	

	atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado	73
Figura 4.9	– Resíduos em função da ordem, do efeito do tipo de estabilizante sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado	73
Figura 4.10	– Gráfico da probabilidade normal esperada dos resíduos	74
Figura 4.11	– Resíduos em função dos valores preditos, do efeito do tipo de estabilizante sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado	74
Figura 4.12	– Análise da interação entre os efeitos umectante e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	82
Figura 4.13	– Análise da interação entre os efeitos tipo de agitação e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	82
Figura 4.14	– Análise da interação entre os efeitos concentração de sorbitol e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	83
Figura 4.15	– Análise da interação entre os efeitos tipo de agitação, umectante e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	83
Figura 4.16	– Análise da interação entre os efeitos da concentração de sorbitol, umectante e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	84
Figura 4.17	– Análise da interação entre os efeitos da concentração de sorbitol, tipo de agitação e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0 ..	84
Figura 4.18	– Análise da interação entre todos os efeitos sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	85
Figura 4.19	– Resíduos em função dos valores preditos da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, para todos os efeitos	87
Figura 4.20	– Diagrama de dispersão: médias e desvios padrões da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado para todos os efeitos,	

	em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	88
Figura 4.21	– Perfil para os valores preditos e desejabilidade da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado para todos os efeitos em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	88
Figura 4.22	– Diagrama de dispersão: médias e desvios padrões da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, para todos os efeitos	91
Figura 4.23	– Análise da interação entre os efeitos do tipo de agitação e umectante sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	97
Figura 4.24	– Análise da interação entre o efeito umectante e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	97
Figura 4.25	– Análise da interação entre os efeitos da concentração de sorbitol e umectante sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	98
Figura 4.26	– Análise da interação entre os efeitos da concentração de sorbitol e tipo de agitação sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	98
Figura 4.27	– Análise da interação entre os efeitos do tipo de agitação e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	99
Figura 4.28	– Análise da interação entre os efeitos da concentração de sorbitol e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	99
Figura 4.29	– Análise da interação entre os efeitos da concentração de sorbitol, tipo de agitação e umectante sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0 ..	100
Figura 4.30	– Análise da interação entre o efeito umectante, tipo de agitação e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	100
Figura 4.31	– Análise da interação entre o efeito umectante, tipo de agitação e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto	

	centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	101
Figura 4.32	– Análise da interação entre os efeitos da concentração de sorbitol, tipo de agitação e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0 ..	101
Figura 4.33	– Análise da interação entre todos os efeitos sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	102
Figura 4.34	– Resíduos em função dos valores preditos dos efeitos umectante, tipo de agitação, concentração de sorbitol e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	105
Figura 4.35	– Perfil para os valores preditos e desejabilidade da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado para todos os efeitos em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	108
Figura 4.36	– Gráfico da probabilidade normal esperada dos resíduos para o modelo da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	108
Figura 4.37	– Resíduos em função da ordem do umectante, tipo de agitação, concentração de sorbitol e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0	109
Figura 4.38	– (a) Superfície de resposta que mostra o efeito das diferentes concentrações de umectante e tempo na atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado. (b) Curva de nível para a superfície do item (a)	117
Figura 4.39	– Perfil para os valores preditos e desejabilidade da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado para os agentes tensoativos	118
Figura 4.40	– Gráfico de normalidade dos erros, da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, em função dos agentes tensoativos	118
Figura 4.41	– Resíduos em função da ordem para a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M,	

	pH 9,0, para os agentes tensoativos	119
Figura 4.42	– Gráfico de Pareto dos efeitos estimado (valor absoluto) sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado	119
Figura 4.43	– Grau de alvura nos corpos de prova após os ensaios preliminares de biopurga, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, sob diversas condições, tendo os corpos de prova da purga alcalina como padrão	124
Figura 4.44	– Grau de alvura nos corpos de prova após os ensaios preliminares de biopurga, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, com preparação e <i>all in</i> , sendo a purga alcalina o padrão	124
Figura 4.45	– Perda de massa nos corpos de prova após os ensaios preliminares de biopurga, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, sob diversas condições, sendo a purga alcalina o padrão	125
Figura 4.46	– Perda de massa nos corpos de prova após os ensaios preliminares de biopurga, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, sob diversas condições, sendo a purga alcalina o padrão	126
Figura 4.47	– Grau de alvura nos corpos de prova após o processo enzimático, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, purga enzimática com caldo bruto centrifugado estabilizado contendo 3 g/L de umectante (PE3CBX) e 5 g/L de umectante (PE5CBX), com Pulpzyme HC contendo 3 g/L de umectante (PE3P) e 5 g/L de umectante (PE5P), tendo os corpos de prova da purga alcalina (PA) como padrão	129
Figura 4.48	– Perda de massa nos corpos de prova após o processo enzimático, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, purga enzimática com caldo bruto centrifugado estabilizado contendo 3 g/L de umectante (PE3CBX) e 5 g/L de umectante (PE5CBX), com Pulpzyme HC contendo 3 g/L de umectante (PE3P) e 5 g/L de umectante (PE5P), tendo os corpos de prova da purga alcalina (PA) como padrão	130

SIMBOLOGIA

A	=	Absorbância
AE	=	Atividade enzimática [U/mL]
Ae	=	Atividade específica [$\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$]
ANOVA	=	Análise de variância
APSU	=	Unidade padrão de atividade de pectinase alcalina
$A_{t_{\text{inicial}}}$	=	Atividade enzimática inicial [U/mL]
$A_{t_{\text{residual}}}$	=	Atividade enzimática remanescente após o tratamento térmico durante um período de incubação [U/mL];
$^{\circ}\text{Berger}$	=	Unidade de medida do grau de brancura ou alvura
βG	=	β -glucosidase, celobiase, β -(1,4)-glicose
C	=	Concentração de açúcar [$\mu\text{mol}/\text{mL}$]
CB	=	Mistura de solução carbonato-bicarbonato
CBD	=	Cellulose Binding Domain
CBH	=	Celobiohidrolase, β -(1,4)-D-glucana celobiohidrolase
CMC	=	Unidade da atividade celulolítica
CMCase	=	Carboximetilcelulose
cN/Tex	=	Unidade de medida utilizado nos testes de resistência
CO	=	Algodão
D	=	Diluição da amostra
Da	=	Dalton
DNS	=	Ácido 3,5 dinitro-salicílico
DP	=	Grau de polimerização
e	=	Coeficiente de extinção molar do <i>p</i> -nitrofenol ($e = 2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
Ea	=	Energia de ativação [cal/mol]
E.C.	=	Enzyme Commission
E_d	=	Energia de desnaturação térmica da enzima [kcal/mol]
EDTA	=	Ácido etilenodiaminotetracético

EG	=	Endoglucanase; β -(1,4)-D-glucana-celobiohidrolase
EglA	=	Endoglucanase
EGU	=	Unidades de atividade de endoglucanase
EGX	=	Exoglucanase
GL	=	Graus de liberdade
GNaOH	=	Solução tampão glicina-NaOH
k	=	Constante de Arrhenius
K	=	Coefficiente de adsorção
k_d	=	Constante de desativação térmica ou desnaturação da enzima [h^{-1}]
K_d^0	=	Fator exponencial
l	=	Comprimento de onda
m_1	=	Massa do corpo de prova antes do tratamento [g]
m_2	=	Massa do corpo de prova após o tratamento [g]
MSR	=	Método de superfície de resposta
PA	=	Purga alcalina
PE	=	Purga enzimática
PECBX	=	Purga enzimática com caldo bruto centrifugado
PE3CBX	=	Purga enzimática com caldo bruto centrifugado contendo 3 g/L de umectante
PE5CBX	=	Purga enzimática com caldo bruto centrifugado contendo 5 g/L de umectante
PEP	=	Purga enzimática com Pulpzyme HC
PE3P	=	Purga enzimática com Pulpzyme HC contendo 3 g/L de umectante
PE5P	=	Purga enzimática com Pulpzyme HC contendo 5 g/L de umectante
PE	=	Pectiesterases
PG	=	Poligalacturonase
PGL	=	Poligalacturonato
PMG	=	Polimetilgalacturonase
PMGE	=	Polimetilgalacturonato esterase
PMGL	=	Polimetilgalacturonato liase
QM	=	Quadrado Médio
R^*	=	Refletância da amostra tingida no comprimento de onda de máxima absorção

R	=	Constante da lei dos gases (1,987 cal/mol.K)
RB	=	Relação de banho
rpm	=	Rotação por minuto [min^{-1}]
S	=	Coeficiente de dispersão [unidade]
SQ	=	Soma dos Quadrados
t	=	Tempo de incubação ou reação [minutos]
$t_{1/2}$	=	Tempo de meia-vida [h^{-1}]
T	=	Temperatura [$^{\circ}\text{C}$] ou temperatura absoluta [K]
U	=	Unidade de atividade enzimática [$\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}$]
Ve	=	Volume de enzima [mL]
V_t	=	Volume total da solução [mL]

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	xiii
SIMBOLOGIA	xviii
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
1.1. MOTIVAÇÃO DO TRABALHO	1
1.2. CONTRIBUIÇÕES DO TRABALHO.....	2
1.3. OBJETIVOS	3
1.3.1. Objetivo Geral.....	3
1.3.2. Objetivos Específicos	3
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. PROCESSOS ENZIMÁTICOS DE BENEFICIAMENTO EMPREGADOS EM FIBRAS CELULÓSICAS	5
2.1.1. Processamento Enzimático do Algodão a Úmido.....	6
2.1.1.1. Desengomagem Enzimática.....	6
2.1.1.2. Biopreparação	7
2.1.1.3. Bioacabamento.....	7
2.1.2. Processamento Enzimático do Denim – Bioestonagem	8
2.2. ENZIMAS UTILIZADAS EM PROCESSOS TÊXTEIS	9
2.2.1. Celulases	11
2.2.2. Xilanases	15
2.3. APLICAÇÕES DE ENZIMAS EM FIBRAS CELULÓSICAS	17
2.3.1. Aplicabilidade de Enzimas para Diferentes Tipos de Fibras.....	17
2.3.2. Bioestonagem.....	18
2.3.2.1. Influência da Presença de Corantes no Tratamento Enzimático.....	19
2.3.3. Estudo das Condições Operacionais do Tratamento Enzimático	20
2.3.3.1. Influência da Agitação Mecânica e Tipo de Equipamento Utilizado no Tratamento Enzimático	22
2.3.3.2. Influência do Pré-Tratamento na Acessibilidade da Enzima à Fibra.....	23
2.3.3.3. Efeito do Surfactante.....	25
2.3.3.4. Tempo de Processo	26

2.3.4. Influência de Agentes Químicos na Atividade de Xilanases – Inibição ou Ativação	26
2.3.5. Estabilidade Térmica de Xilanases	28
CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. MATERIAL.....	36
3.1.1. Enzimas.....	36
3.1.2. Substrato Têxtil.....	36
3.1.3. Reagentes	37
3.1.4. Equipamentos.....	38
3.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	38
3.2.1. Caracterização dos Corpos de Prova	39
3.2.1.1. Grau de Branco ou Grau de Alvura	39
3.2.1.2. Hidrofilidade	39
3.2.1.3. Perda de Massa	39
3.2.1.4. Reprodutibilidade.....	40
3.2.2. Caracterização das Preparações Enzimáticas	40
3.2.2.1. Determinação das Proteínas	40
3.2.2.2. Determinação da Atividade Enzimática.....	40
3.2.2.3. SDS-PAGE	42
3.3. PROPRIEDADES CATALÍTICAS DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS	43
3.3.1. Influência da Temperatura na Atividade Enzimática	43
3.3.2. Desnaturação Enzimática.....	43
3.3.3. Efeito do Tipo de Tampão e Estabilizantes	45
3.3.4. Efeito de Inibição e Ativação na Atividade Enzimática	45
3.3.5. Efeito de Agentes Tensoativos	46
3.4. PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO	46
3.5. PROCESSOS UTILIZADOS	50
3.5.1. Purga Enzimática	50
3.5.2. Purga Alcalina.....	53
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA	55
4.2. ATIVIDADE CELULOLÍTICA	55
4.3. ATIVIDADE XILANOLÍTICA EM FUNÇÃO DO pH E DA TEMPERATURA	56
4.4. ESTABILIDADE TÉRMICA	58
4.4.1. Energia de Ativação da Reação Enzimática	62

4.4.2. Constante de Desativação Enzimática	64
4.5. EFEITO DO TAMPÃO E DOS ESTABILIZANTES	66
4.5.1. Efeito da Concentração de Estabilizante	76
4.5.1.1. Análise para a Concentração de 0,5 e 1,0 M de Sorbitol.....	77
4.6. EFEITO DE AGENTES QUÍMICOS	110
4.7. EFEITO DOS AGENTES TENSOATIVOS.....	111
4.8. EFEITO DO CARBONATO-BICARBONATO USADO COMO TAMPÃO.....	121
4.9. ENSAIOS DE BIOPURGA EM MALHA COM XILANASE.....	121
4.9.1. Ensaios Preliminares – Caldo Bruto sem Estabilização	121
4.9.2. Ensaios com o Caldo Bruto Estabilizado.....	126
4.9.3. Avaliação dos Efeitos do Caldo Bruto Estabilizado na Biopurga	131
4.9.4. Considerações	131
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES	134
CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	136
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
GLOSSÁRIO.....	148
APÊNDICE A – Atividades remanescentes.....	153
ANEXO A – Características das fibras e beneficiamento têxtil.....	156
ANEXO B – Material e métodos para produção do caldo bruto centrifugado de <i>Bacillus pumilus</i> CBMAI 0008	173

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

O processo têxtil utiliza muitos insumos químicos. Conforme sua relação estabelecida com o meio ambiente pode ser classificado como “química agressiva” e “química limpa”. A primeira utiliza álcalis, ácidos, oxidantes e redutores energéticos, que ocasionam degradação aleatória da superfície da fibra e impacto considerável de contaminação ao meio ambiente. A segunda utiliza procedimentos que não agridem as fibras e nem o meio ambiente, principalmente nas etapas de pré-tratamento, como purga e alveamento. Esses procedimentos correspondem, por exemplo, à utilização de enzimas, que atuam sob condições mais brandas (CEGARA, 2000; HOONDAL *et al.*, 2002; GÜBITZ, 2001).

A partir da década de 80, em alguns setores do processo de beneficiamento de produtos têxteis, teve início uma inovação visando manter a competitividade das fibras de algodão em relação às sintéticas. Essa inovação buscava reduzir o custo e melhorar a qualidade tanto do tecido quanto do efluente produzido e conferir maior valor agregado ao produto, desde o processo de preparação até o acabamento. Essas inovações técnicas desencadearam avanços da biotecnologia e melhoria genética da fibra, através da determinação da estrutura do genoma do algodão e manipulação do gene, influenciando o beneficiamento químico têxtil dos tecidos de algodão (HOLME, 2005).

A aplicação de enzimas em processos industriais limita-se à forma disponível desses agentes biológicos na forma nativa. Entretanto, deve-se considerar que as novas técnicas de biologia molecular, metodologias de seleção de biocatalizadores e novas abordagens de pesquisa, foram e estão sendo desenvolvidas visando catalisadores com suas especificidades alteradas, bem como a exploração da biodiversidade (CONTI *et al.*, 2001).

1.1. MOTIVAÇÃO DO TRABALHO

O surgimento de leis ambientais mais restritas e consumidores mais exigentes tanto com a qualidade do produto têxtil quanto com o do ciclo de vida do produto, promovem a substituição ou desenvolvimento dos processos tradicionais de preparação dos tecidos têxteis, compreendendo os processos de purga e pré-alveamento, por processos mais ecológicos. 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), que a do processo de purga tradicional, que se situa na faixa de 90°C, implicando num menor consumo de energia;
- As fibras são preservadas de ataques químicos generalizados ocasionados pelos produtos químicos utilizados no processo convencional como os álcalis e oxidantes, resultando em elevada perda de massa e diminuição da resistência das fibras;
- 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 (biopurga) devido à redução da carga de produtos químicos em relação ao processo convencional (purga alcalina) e maior degradabilidade do efluente gerado no processo.

Apesar das vantagens apresentadas relativas aos processos enzimáticos, sua utilização nos processos industriais está condicionada a fatores de custo e eficiência dos mesmos. O custo das enzimas comerciais tem reduzido consideravelmente nos últimos anos, tornando a tecnologia competitiva, mas ainda posicionada em um patamar de 20% acima dos processos tradicionais.

A eficiência do processo enzimático nem sempre é verificada nas indústrias, pois não possuem a infra-estrutura técnica e laboratorial necessária para a determinação da atividade enzimática e desenvolvimento de melhorias no processo. Todos os desenvolvimentos estão concentrados em alguns poucos fornecedores mundiais de enzimas.

No presente trabalho foi estudada a estabilização da xilanase, proveniente do caldo bruto de cultivo, centrifugado, de *Bacillus pumilus* CBMAI 0008, para aplicação na purga enzimática de tecidos de malha 100% algodão, tendo como parâmetro comparativo enzimático a xilanase estabilizada e disponível comercialmente, pela Novozymes, Pulpzyme HC.

1.2. CONTRIBUIÇÕES DO TRABALHO

As principais contribuições do presente trabalho, em relação ao caldo bruto, centrifugado, de xilanase de *B. pumilus* CBMAI 0008, foram:

- A viabilização técnica da sua utilização após estabilização com o polioliol, sorbitol, na biopurga de tecidos de malha 100% algodão.
- A determinação do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), constante de desnaturação térmica (k_d), energia de ativação (E_a) e energia de desnaturação térmica (E_d);
- A determinação do efeito de alguns íons, que podem estar presentes na superfície da fibra de algodão, e durante o processo de purga enzimática afetariam o desempenho enzimático;
- A avaliação do efeito dos agentes tensoativos empregados na indústria têxtil sob a estabilidade térmica e atividade enzimática.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi a determinação da condição ótima de estabilidade do caldo bruto centrifugado de *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 para aplicação no processo de biopurga em tecidos de malha de fio cardado 100% algodão

1.3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do uso de diferentes polióis (glicerol, sorbitol e xilitol) na estabilidade do caldo bruto, centrifugado, de xilanase de *B. pumilus* CBMAI 0008, através da atividade remanescente;
 - Avaliar a influência de diferentes agentes químicos na atividade do caldo bruto centrifugado de *B. pumilus* CBMAI 0008;
 - Avaliar o desempenho enzimático do caldo bruto centrifugado após a correção de pH para a faixa alcalina (pH 9,0);
 - Avaliar a influência dos parâmetros da biopurga: tempo de incubação, concentração de emulsificante e umectante na estabilidade do caldo bruto estabilizado com polioliol;
-

- Determinar as condições que devem ser empregadas na biopurga das fibras de algodão;
 - Avaliar a qualidade conferida, aos tecidos em malhas de fio cardado 100% algodão, pela biopurga em relação a purga convencional, através das propriedades: hidrofiliidade; grau de alvura e perda de massa.
-

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O pré-tratamento enzimático de tecidos (planos, malhas, felpudos, etc.) requer o conhecimento das características das fibras celulósicas como a possível presença de interferentes que podem inativar as enzimas, quando estas são aplicadas de forma isolada ou combinadas, das características das enzimas como especificidade, atividade; dos parâmetros operacionais como a presença de tensoativos, agitação mecânica, concentração de enzimas e a eficiência do processo enzimático.

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, celulase e xilanase, que podem ser utilizadas nos processos de beneficiamento têxtil.

2.1. PROCESSOS ENZIMÁTICOS DE BENEFICIAMENTO EMPREGADOS EM FIBRAS CELULÓSICAS

Historicamente, as pesquisas visando à utilização de enzimas no processamento têxtil, tiveram início a partir do século XX. Durante esse período, foi avaliado o potencial das enzimas proteolíticas na remoção de escamas da fibra de lã, para melhorar o comportamento antifeltro. Porém, devido à natureza heterogênea e perdas inaceitáveis de resistência, ainda não foi possível chegar a um processo industrial otimizado. Na década de 60, surgiram os detergentes biológicos, que possuíam em sua formulação as enzimas proteases para remoção de manchas orgânicas causadas por proteínas do ovo, sangue, etc. Na década de 70, descobriu-se que a adição das enzimas celulases à lavagem conferia detergência e removiam a fibrilação em múltiplas lavagens dos tecidos (GÜBITZ, 2001).

As aplicações de enzimas podem ser divididas quanto ao uso industrial, médico, analítico e científico. As principais aplicações, industriais, visam a melhorar processos e possibilitar o uso de novas matérias-primas, melhorando suas características físico-químicas. A proporção utilizada de enzimas em processos industriais apresenta grandes variações. A indústria de detergentes consome entre 40-45% das enzimas produzidas, enquanto a indústria

têxtil e de papel entre 4-6% (ABRAHÃO NETO, 2001).

A utilização de enzimas no processo têxtil apresenta numerosas vantagens, sendo uma das principais o melhoramento do processo, pois substitui produtos químicos normalmente utilizados em algumas etapas dos processos têxteis, reduzindo consideravelmente o impacto ambiental, assim como os danos às fibras. Melhora a qualidade dos produtos, pois é altamente específica, permitindo a produção de produtos acabados de melhor qualidade com relação ao aspecto visual, toque e propriedades de resistência. Reduz o desgaste do equipamento e confere maior flexibilidade na sua utilização. Possibilita economia de energia, requer maior controle do processo e possibilita aumento de produtividade (COMOLI-LAMBERTI, 1999; CUNHA *et al.*, 2000).

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, que é um tecido plano de algodão tipo sarja 3/1, com o urdume, fio tinto com índigo – vertical, e a trama, fio cru – horizontal), tem-se a bioestonagem.

2.1.1. Processamento Enzimático do Algodão a Úmido

2.1.1.1. Desengomagem Enzimática

A engomagem visa garantir a resistência ao cisalhamento e esforços no processo de tecelagem sem excessiva ruptura de fios. Consiste na aplicação de uma solução colante 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 pela desengomagem, como 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).

2.1.1.2. Biopreparação

As fibras de algodão são compostas por celulose e várias substâncias não celulósicas como ceras, substâncias pécnicas e proteínas. A cera, substâncias pécnicas e proteínas encontram-se no estado amorfo. A camada de celulose primária é muito mais amorfa que a camada secundária (corpo principal da fibra), como mostrado na Figura A.1 do Apêndice A. As substâncias não celulósicas, considerando-se a composição média das fibras, são responsáveis por uma porcentagem de 4 a 12% de massa da fibra de algodão (Tabela A.3 do Apêndice A). A superfície da fibra possui microporos ou fendas, por isso, pode-se considerar que a superfície do algodão é mais suscetível à hidrólise enzimática que a celulose da parede secundária (PACHECO, 2001).

A biopreparação, biopurga, purga enzimática ou *bioscouring* objetiva a remoção das impurezas não celulósicas com enzimas como pectinases para remoção da pectina; proteases para proteínas; lipases para os óleos e ceras, xilanases para hemiceluloses, etc. Como alguns pigmentos naturais não podem ser desprendidos da fibra, por estarem associados a impurezas, a remoção dessas impurezas remove esses pigmentos, reduzindo o amarelado da fibra. Geralmente as enzimas usadas para a biopurga são selecionadas com base no pH, temperatura, tempo de tratamento requerido, qualidade do produto final, absorção de água e alvura (HOONDAL *et al.*, 2002).

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 a purga enzimática exige temperaturas menores que a purga convencional (AXT-MARTINELLI, 2002).

2.1.1.3. Bioacabamento

O conceito de bioacabamento, biopolimento ou *biopolishing* surgiu no Japão em 1988, inicialmente para os tecidos planos de algodão e mais tarde foi estendido para os tecidos de malha. O bioacabamento objetiva eliminar as microfibrilas superficiais da fibra de algodão pela ação dos componentes da enzima celulase (endocelulase, exocelulase e β -glicosidase). A celulase modifica a superfície do tecido de algodão, aumentando a sua suavidade e maciez, de modo permanente e não envolve nenhuma agressão química (CEGARA, 2000; CONTRERAS, 2001).

A utilização de enzimas no processo de acabamento produz artigos têxteis com um maior conforto no uso (maciez ao toque, reduzida tendência a *pilling*) e aumento do brilho, da mesma forma que reduz o encolhimento no caso dos tecidos de lã. Esses efeitos são alcançados somente quando a seleção das enzimas é adequada (LIPP-SYMONOWICZ *et al.*, 2004).

2.1.2. Processamento Enzimático do Denim – Bioestonagem

O denim, ou jeans, é um material extremamente firme e durável, mas duro e desconfortável para o uso enquanto novo, por isso são realizadas lavações sucessivas para conferir maciez e conforto além de aspecto gasto e desbotado aos jeans azuis. A essas lavações com adição de pedras-pomes, para conferir aspecto desbotado ao artigo denim, dá-se o nome de estonagem ou *stonewashing* (ANDREAUS, 2001).

A bioestonagem, biolavagem ou *biostoning* foi introduzida na Europa em 1989 e a primeira vez nos Estados Unidos em 1990, a fim de substituir parcialmente ou na totalidade as pedras-pomes. Com o objetivo de não expelir poeira residual e causar problema de abrasão na máquina, causada pela estonagem tradicional.

O uso das celulases confere o aspecto desbotado, diminui a resistência à flexão, tornando o uso dos artigos mais agradável, inclusive melhorando o toque. Entretanto, a utilização de celulase apresenta o inconveniente de redepositar, sobre o fio branco ou no fio tingido do denim, o índigo removido. Este problema é conhecido como *backstaining*, pois diminui o contraste desejado entre a trama e o urdume. Dentre as celulases ácidas, neutras e alcalinas, as celulases ácidas são as que causam *backstaining* em níveis não aceitáveis. O problema de *backstaining* pode ser superado com o uso de protease alcalina engenheirada (pH 8-10) que pode atuar em temperatura entre 30 a 60°C, e baixa dosagem, tipicamente 0,01% em massa (ANDREAUS, 2001; HOLME, 2005).

Segundo Andraeus (2001) as principais vantagens da bioestonagem com celulases são: condições moderadas (temperatura entre 40-60°C, pressão normal); reação específica das celulases com a celulose; origem natural; biodegradabilidade.

Segundo trabalhos citados em Cegara (2000), as celulases empregadas atualmente para o desbotamento são as neutras e as ácidas, as quais podem estar compostas de endo-, exo- e β -glucosidase. As celulases neutras apresentam seu máximo efeito de desbote em pH 6, e devem ser utilizadas para conseguir efeitos mais acentuados em tratamentos mais intensos

(60 minutos a 55°C), enquanto as ácidas necessitam de pH 5 e seriam indicadas para tratamentos rápidos (30 minutos a 45-55°C). Entretanto, deve-se considerar que devido aos diferentes tipos de celulases oferecidas no mercado é conveniente seguir as prescrições de utilização dos fornecedores.

Visando efeito mais preciso, foram desenvolvidas enzimas celulases monocomponentes. Essas celulases monocomponentes, foram introduzidas no mercado pela Novozymes em 1997, pela linha de produtos DeniMax. Esta linha é composta por três séries: série 300, cuja abrasão ocorre a um pH elevado que proporciona grande contraste e boa conservação da resistência; série 400, que produz nível de contraste mais elevado que a 300 e menor perda de resistência em relação às outras celulases comerciais da Novozymes e série 500, com abrasão elevada e ação mais rápida das 3 celulases monocomponentes desta linha de produtos. São apresentadas na forma concentrada ou como produto formulado completo e pronto para uso, com um sistema anti-redeposição e tampão. Estas séries podem ser usadas com Denilite, que é um sistema de lacase produzida pela empresa para branquear jeans como substituto parcial do hipoclorito (NOVO NORDISK, 2000).

2.2. ENZIMAS UTILIZADAS EM PROCESSOS TÊXTEIS

O estado físico em que as enzimas são apresentadas depende da forma de aplicação que proporcione melhores resultados, ou seja, se é melhor utilizar as enzimas em estado “puro” ou em formulações enzimáticas. Entende-se por formulação enzimática, líquida ou sólida, aquela que contém a quantidade correta de uma enzima ou de uma mistura de enzimas, com uma mescla de produtos auxiliares que permitam obter o efeito desejado, com a melhor qualidade e o menor custo possível (COMOLI-LAMBERTI, 1999; ANDREAUS, 2001).

Os processos enzimáticos têm sido desenvolvidos para o processamento a úmido de produtos têxteis, abrangendo as operações de preparação ao acabamento. Muitas enzimas utilizadas na indústria têxtil como as carbohidrolases (celulase, pectinase, xilanase, amilase), proteases e enzimas oxidativas (lacase, manganês peroxidase) são secretadas por fungos no ambiente. Os fungos usam essas enzimas extracelulares para decompor polissacarídeos, proteínas e ligninas da biomassa em unidades menores que podem ser transportadas para dentro da célula que passa a agir como substrato de crescimento. A Figura 2.1 apresenta as etapas no processamento de têxteis na qual podem ser utilizadas enzimas (GÜBITZ, 2001;

ALY *et al.*, 2004).

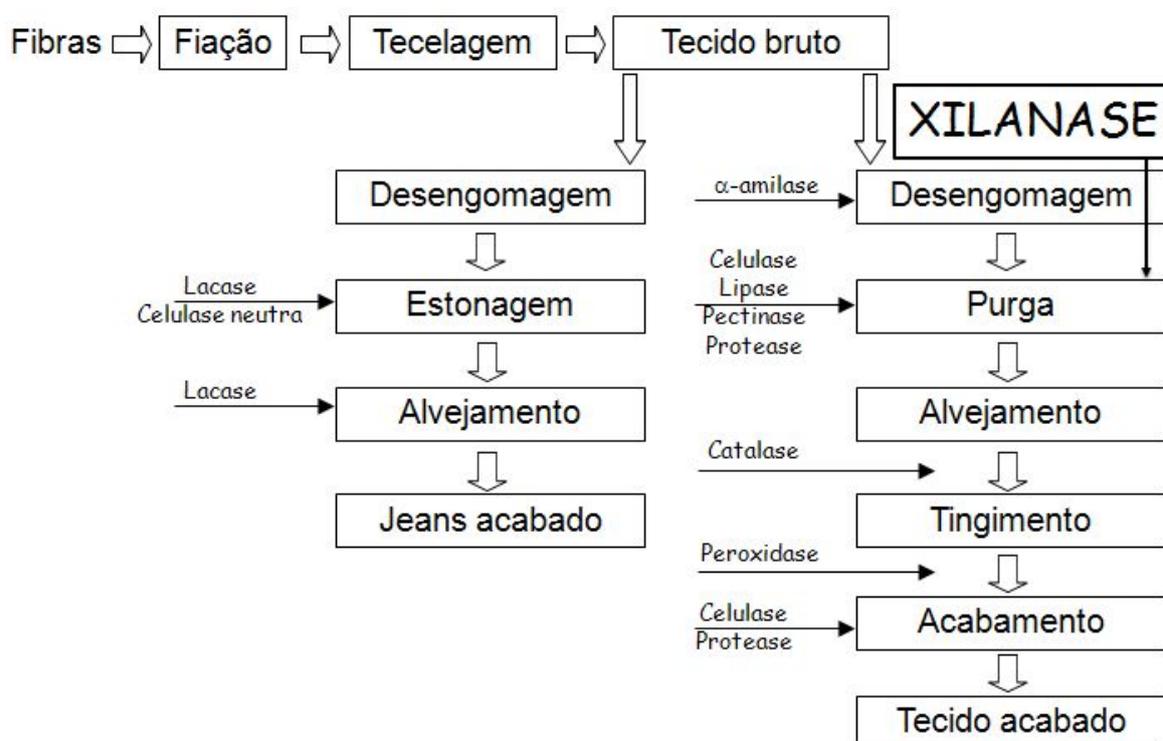


Figura 2.1. Enzimas usadas nas várias etapas do processamento têxtil a úmido e no processamento do Denim. FONTE: GÜBITZ, 2001; KIRK *et al.*, 2002.

Antes do tingimento do fio ou tecido, de algodão, estes passam por várias etapas no processo têxtil. Uma etapa importante é a lavagem para a eliminação total ou parcial dos componentes não-celulósicos encontrados no algodão bruto, bem como impurezas de lubrificantes de máquinas e de engomagem. Essa lavagem, conhecida como purga, que utiliza produtos químicos altamente alcalinos como o hidróxido de sódio, produz no tecido uma maior hidrofiliabilidade permitindo que ele seja branqueado e tinto com sucesso. O inconveniente destes produtos químicos na remoção das impurezas é o ataque à celulose, reduzindo o massa e a resistência do tecido. A Tabela 2.1 apresenta a comparação entre alguns parâmetros relacionados à qualidade do tecido tratado e do processo utilizado no equipamento de tingimento a jato (BIOTIMES, 1999).

A maioria dos microrganismos produtores de enzimas como xilanase, podem produzir xilanases com celulases ou ausente de celulases (cellulase-free xylanase), ou ainda a xilanase apresentar comportamento de atuação similar ao de uma celulase. Por isso, estas enzimas serão abordadas a seguir.

Tabela 2.1. Comparação entre o processo enzimático e alcalino realizados em um equipamento de tingimento a jato.

Medida	BioPreparation	Lavagem alcalina
pH	8,00-9,50	13,00-14,00
Temperatura (°C)	50-60	90-100°C
Pectina residual (%)	22-30	10-15%
Perda de massa (%)	< 1,50	3,00-8,00%
Hidrofilidade (segundos)	< 1	< 1
Resistência à ruptura (%)	95-100	90-97
Aumento do brilho (%)	+1-5%	+5-10
Branqueabilidade	Idêntica	
Tingibilidade	Idêntica com tinturas de tons escuros	
Consumo de água de enxágue (%)	40-50	100
Sólidos totais dissolvidos (%)	20-50	100

FONTE: BIOTIMES, 1999.

2.2.1. Celulases

No ecossistema típico de degradação de celulose muitas bactérias e fungos celulolíticos atuam com microrganismos relacionados para converter substratos celulósicos insolúveis em açúcares solúveis – principalmente celobiose e glicose, que são então assimilados pela célula. Sistemas de enzimas múltiplos são assim requeridos para degradar eficientemente a celulose. Tais sistemas abrangem ou uma coleção de celulases livres e/ou complexos multicomponentes chamados celulosomas (BAYER *et al.*, 1998).

Segundo Bhat e Bhat (1997), as celulases têm sido utilizadas na indústria têxtil para remoção do excesso de corante do tecido denim no pré-desbotamento do jeans azul; remoção de microfibrilas salientes dos tecidos de algodão depois de vários ciclos de lavagem; reconstituição da maciez e brilho da cor nos tecidos de algodão. Enquanto segundo Cavaco-Paulo (1998) e Andraeus (2001), as celulases têm o uso aumentado na indústria têxtil, principalmente no acabamento e lavagem. Conforme a atividade e o pH, as celulases podem ser classificadas em: i) ácidas, cujo pH de atuação varia entre 4,5 e 5,5 e a temperatura entre 45-55°C; ii) neutras pH 5,5-8,0 e temperatura 50-60°C e iii) alcalinas que são utilizadas em detergentes. A mistura de celulases ácida e neutra é conhecida como celulase “híbrida”. 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. Esta é a chave para o entendimento dos mecanismos pelos quais os efeitos causados pelas celulases são obtidos.

Independente da classificação, as celulases catalisam a hidrólise e a degradação da celulose, causando diferenças importantes nas propriedades macroscópicas dos tecidos tratados como perda de massa, diminuição do grau de polimerização, e conseqüentemente a perda da resistência à tração. Por isso, se faz necessário o conhecimento e controle de todos os parâmetros, para evitar tratamentos excessivos ou indevidamente controlados que ocasionem severos danos aos tecidos e, portanto prejuízos econômicos (ANDREAUS, 2001).

Os diferentes modos de ação das enzimas celulolíticas sobre o substrato polimérico são comumente descritas como ataques do tipo endo e exo. As celulases são multicomponentes, ou seja, são misturas de três diferentes tipos de enzimas que atuam em sinergismo, na degradação da celulose a até glicose: a endoglucanase (EG, β -(1,4)-D-glucana 4-glucano hidrolase, E.C. 3.2.1.4), a celobiohidrolase (CBH, β -(1,4)-D-glucana celobiohidrolase, E.C. 3.2.1.91) e celobiase (β G, β -(1,4)-glicose, E.C. 3.2.1.21). Existem ainda as exoglucanases (EGX, β -(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 degradação do polímero de celulose é realizada pela ação das celulases multicomponentes que atuam em sinergia. A Tabela 2.2 apresenta os componentes da celulase de fungos aeróbios e seu modo de ação na cadeia celulósica e o grau de sinergismo é apresentado na Tabela 2.3. Verifica-se que 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. O esquema de atuação das enzimas do complexo celulase sobre a estrutura da celulose é apresentado na Figura 2.2 (TEERI, 1997; CAVACO-PAULO, 1998; ABRAHÃO NETO, 2001; ANDREAUS, 2001; MIZUTANI *et al.*, 2002).

Segundo Andraeus (2001), o procedimento geral para a aplicação de celulases, em bioestonagem, deve seguir os seguintes passos: introduzir os artigos de fibras de celulose na máquina; ajustar as condições operacionais, como pH e temperatura; adicionar a enzima; controle do tempo, temperatura, pH e agitação mecânica durante o processamento; interromper a atuação da enzima (*enzyme stop*) pela adição de carbonato de cálcio (Na_2CO_3) e/ou aumento de temperatura a 80°C durante 10 minutos; lavagem final com detergente.

Tabela 2.2. Componentes de celulase de fungos aeróbios e seu modo de ação na cadeia celulósica.

Enzima	Sinônimo	Modo de Ação/Produtos
Endo- β -(1-4)-D-glucanase EG (E.C. 3.2.1.4)	Endo- β -(1-4)-glucosidase; β -(1-4)-glucano hidrolase; Endoglucanase; Endocelulase; Carboximetilcelulase (CMCase) ou Celulase Cx.	Quebra as ligações internas nas regiões amorfas, de forma aleatória, liberando celo-oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização e celobiose. Também libera terminais livres para a ação da exoglucanase.
Exo- β -(1-4)-D-glucanase CBH (E.C. 3.2.1.91)	Exo- β -(1-4)-glucosidase; β -(1-4)-glucano celobiohidrolase; Celobiohidrolase; Exocelulase; Avicelase ou Celulase C1.	Liberam a celobiose da extremidade não reduzida e podem também atuar na celulose cristalina.
Exo- β -(1-4)-D-glucosidase EGX (E.C. 3.2.1.74)	Exoglucosidase ou β -(1,4)-D-glucan-glucohidrolase	São ativas na celulose cristalina. Hidrolisam a celulose, no terminal não reduzido, produzindo polímeros de glicose.
β -glucosidase β G (E.C. 3.2.1.21)	β -(1-4)-glicose Celobiase	Libera glicose da celobiose e celo-oligossacarídeos de cadeia curta (celodextrinas).

FONTE: BHAT e BHAT, 1997; DA-SILVA *et al.*, 1997.

Tabela 2.3. Atividades relativas de celulases de *Trichoderma koningi* sobre a hidrólise completa de celulose de algodão.

Enzima	Atividade Relativa	Enzima	Atividade Relativa
EG	< 1%	CBH + β G	4%
CBH	< 1%	EG + CBH + β G	103%
β G	Nenhuma	Caldo de cultura inicial	100%
EG + β G	5%		

FONTE: ABRAHÃO NETO, 2001.

Muitos estudos foram realizados nos sistemas de celulase de fungos aeróbios *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Fusarium solani*, *Talaromyces emersonni* e *Trichoderma koningii*. Também foram identificados outros microrganismos produtores de celulase ativa tais como os fungos aeróbios termofílicos (*Sporotrichum termophile*, *Thermoascus aurantiacus*, *Chaetomium*

thermophile, *Hemicola insolens*), fungos anaeróbios mesofílicos (*Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis*, *Sphaeromonas communis*) bactérias aeróbias mesofílicas e termofílicas (*Acetovibrio cellulolyticus*, *Bacteróides succionogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Clostridium thermocellum*). Dentre estes microrganismos, os termofílicos celulolíticos são os mais interessantes, pois as celulases são geralmente estáveis sob uma variedade de condições severas incluindo pH altamente ácido e alcalino, bem como temperaturas superiores a 90°C (BHAT e BHAT, 1997).

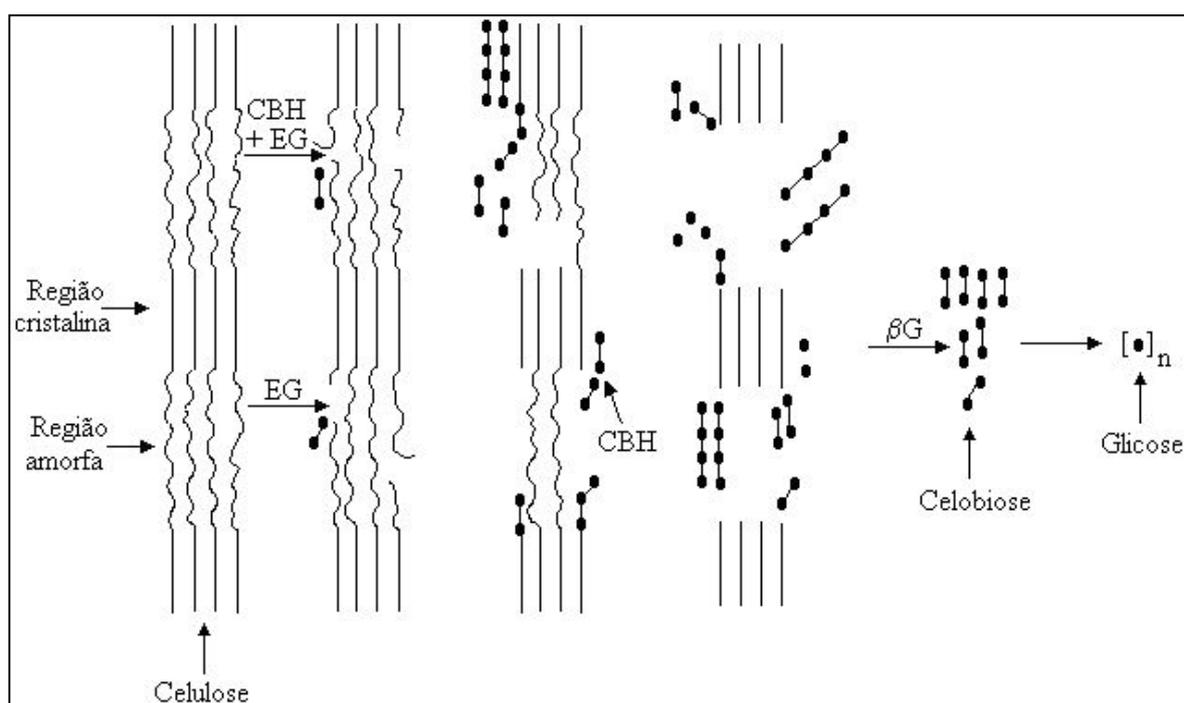


Figura 2.2. Atuação das enzimas multicomponentes da celulase na estrutura da celulose.

FONTE: Adaptação de ANDREAUS, 2001.

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

A maioria das celulases fúngicas é constituída por dois domínios: um grande domínio catalítico e um pequeno domínio de ligação à celulose (*Cellulose Binding Domain* – CBD). O domínio catalítico é o local em que ocorre a hidrólise das cadeias de celulose, ou seja, é o centro ativo que atua sobre o substrato. A catálise de hidrólise das ligações glicosídicas β-(1,4)-D está associada à presença de grupos aminoácidos como o aspartato ou glutamato. O CBD estabelece a ligação com o substrato via ligações hidrofóbicas e interação de

Van der Waals. É essencial a atividade na celulose cristalina, apesar de possuir atividade própria de hidrólise, mas interage sinergisticamente com o domínio catalítico. A ligação do CBD com o domínio catalítico é realizada por um polipeptídeo, conhecido como *linker*. O *linker* é responsável pela flexibilidade dos dois domínios. Podem ser citadas como celulases que não possuem CBD e *linker*, a EG III do *Trichoderma reesei* e a EG I, EG III e EG VI do *Humicola insolens*. A presença de CBD é essencial para a degradação da celulose cristalina sólida. A remoção do CBD tipicamente resulta na diminuição de aproximadamente 50-80% da atividade da celulase fúngica sobre os substratos insolúveis, mas não nos solúveis (ANDREAUS, 2001; HEIKINHEIMO *et al.*, 2000).

A adição de celulases totais ao banho de biopurga tem demonstrado o aumento da eficiência de pectinases e de xilanases. Acredita-se que as celulases eliminam as impurezas indesejáveis pela hidrólise da celulose subjacente, porém a esse mecanismo, o dano típico das celulases às fibras pode ocorrer (AXT-MARTINELLI, 2002).

2.2.2. Xilanases

Xilanas são polissacarídeos de resíduos de D-xilopiranosil, unidas por ligações β -(1,4)-glicosídicas, nos quais os resíduos de xilopironose podem ser substituídos por D-xilose, D-arabinose, D-galactose, D-manose e seus ácidos urônicos. A degradação completa desse polissacarídeo necessita de enzimas específicas, como as do complexo xilanolítico. As enzimas do complexo xilanolítico podem ser divididas em enzimas que degradam a cadeia principal (endo- β -(1,4)-xilanase e β -xilosidase) e enzimas que degradam as cadeias laterais (β -glucuronidase, β -L-arabinofuranosidase e acetilesterase). A endo- β -(1,4)-xilanase (E.C. 3.2.1.8) forma o principal grupo de enzimas envolvidas na degradação da xilana, degrada aleatoriamente a cadeia principal de xilana, liberando xilo-oligossacarídeos. A degradação completa desta cadeia principal ocorre por uma ação sinérgica de endo e exo-xilanases (β -xilosidases ou β -D-xilosídeo xilohidrolases), que hidrolisam os xilo-oligômeros de baixa massa molar (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Do ponto de vista industrial, os fungos filamentosos são interessantes produtores de xilanases, pois excretam as enzimas que degradam a xilana no meio fermentativo, eliminando a necessidade de rompimento celular. A produção de xilanase em culturas de fungos é comumente mais elevada do que em leveduras ou em bactérias. As xilanases livres de

celulases proporcionam a remoção seletiva da xilana da lignocelulose sem afetar a estrutura da fibra da celulose (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Dentre os gêneros produtores de xilanases pode-se destacar *Aspergillus*, *Bacillus* e *Trichoderma*. Geralmente são acompanhadas de pequenas quantidades de hemicelulases e celulases, sendo que algumas endocelulases não específicas são capazes de clivar xilanas. Por isso, sugere-se no processo de biopurga de algodão a adição de hemicelulases e celulases.

As várias aplicações das xilanases têm estimulado pesquisas destas importantes enzimas da família das glicosil hidrolases. As xilanases microbianas (β -(1,4)-D-xilana xilano-hidrolase, EC 3.2.1.8) são catalisadores preferidos para a hidrólise da xilana devido à sua alta especificidade, condições de reações brandas, perda do substrato negligenciável e tamanho do produto gerado. São proteínas de subunidades únicas com massa molar variando entre 8–145 kDa. Na maioria das vezes, as bactérias produzem dois tipos de xilanase, uma xilanase ácida de alta massa molar e uma xilanase alcalina de baixa massa molar. Nos fungos é mais comum xilanases alcalinas de baixa massa molar e geralmente são menos termoestáveis que as bacterianas. A temperatura ótima para a endoxilanase de fontes bacterianas e fúngicas variam entre 40-60°C. A composição de aminoácidos de xilanases pesquisadas de várias fontes indica predominantemente cadeia lateral ácida (ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, serina e treonina) (KULKARNI *et al.*, 1999).

Xilanases fúngicas são geralmente associadas com celulases. A produção seletiva de xilanases é possível no caso de espécies pertencentes aos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* usando apenas xilana como fonte de carbono. Na celulose estas linhagens produzem ambos celulases e xilanases que podem ser devido a traços de hemicelulose presentes nos substratos celulósicos (KULKARNI *et al.*, 1999).

A reação de hidrólise catalisada pelas xilanases bem como celulases ocorrem por um mecanismo ácido-base envolvendo dois resíduos. O primeiro resíduo age como catalisador geral e sobre oxigênio protonado da ligação osídica. O segundo resíduo age como um nucleófilo que, no caso de retenção de enzimas, interage com o oxocarbono intermediário ou promove a formação de um íon OH⁻ da molécula de água, como observado para a inversão de enzimas (KULKARNI *et al.*, 1999). A reação esquemática da atuação da xilanase na xilana é apresentada na Figura 2.3.

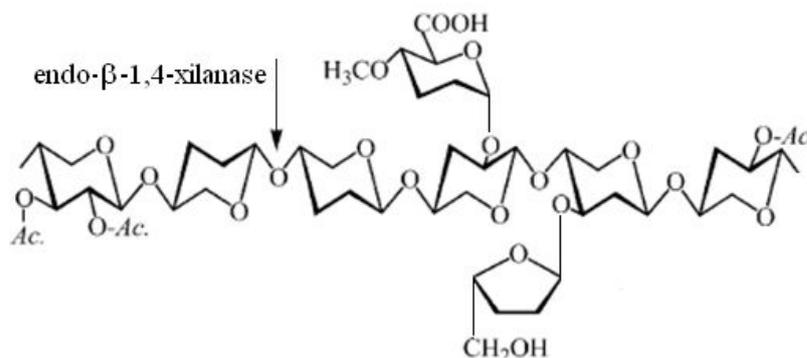


Figura 2.3. Atuação da endo- β -1,4-xilanase na xilana. FONTE: COLLINS *et al.*, (2004) modificado.

2.3. APLICAÇÕES DE ENZIMAS EM FIBRAS CELULÓSICAS

Os estudos de aplicabilidade de enzimas em fibras têxteis visam à reprodutibilidade de qualidade nos substratos tratados principalmente umectabilidade. Numerosos trabalhos já foram desenvolvidos para otimizar ou “entender” o comportamento e atuação das enzimas nos processos enzimáticos. A seguir serão apresentados os estudos já realizados em processos têxteis aplicando enzimas de diferentes origens e natureza (celulolítica, proteolítica, etc.) agrupadas conforme o principal objetivo que foi estudado no trabalho.

2.3.1. Aplicabilidade de Enzimas para Diferentes Tipos de Fibras

A utilização de enzimas em processos têxteis deve considerar a aplicabilidade de uma dada enzima para vários tipos de fibras, uma vez que o processo de purga convencional permite esta possibilidade. Por isso, Buschle-Diller *et al.* (1994) pesquisaram se o tratamento enzimático, com celulase de *Trichoderma viride*, utilizado em fibras de algodão, seria válido para as fibras celulósicas: linho e ramie; celulósicas regeneradas: viscose raioim e para a mistura de algodão/linho. Verificaram que a hidrólise enzimática reduziu a espessura, a elasticidade e no geral afrouxou a estrutura de todos os tecidos celulósicos do estudo. No tratamento prolongado algodão, linho e viscose raioim perderam massa com taxa mais rápida que o ramie e a mistura de algodão/linho. Ocorreu a eliminação das fibras em todos os casos com 6 horas de tratamento. A relação resistência/perda de massa do ramie e linho diferiu do algodão e viscose raioim. Verificaram que a microscopia luminosa combinada com corante

Congo Red pode ser usada para monitorar a localização do ataque enzimático no linho e algodão, mas não para viscose raiom e ramie. Os índices de cristalinidade das amostras não mudaram depois da hidrólise enzimática, nem acessibilidade da mistura.

Lipp-Symonowicz *et al.* (2004), avaliaram o efeito do tratamento enzimático, com enzimas de natureza celulolítica (Tinozym CEL da Ciba Geigy A. G., com 542,5 EGU/dm³ e Cellulosoft Ultra L da Novozymes, com 500,0 EGU/dm³) e pectinolítica (BioPrep L da Novozymes, com atividade 3000 APSU/g), na estrutura morfológica e propriedades da fibra do linho, bem como os parâmetros do fio obtido a partir destas fibras. Quando considerada apenas a utilização dos agentes pectinolíticos foi observado que as enzimas acarretaram diferentes alterações na fibra do linho, como aumento do brilho e frescor ao toque. No caso dos agentes celulolíticos, devido a alterações na superfície das fibras elementares e técnicas, a resistência à tensão do fio não foi baixada, enquanto a massa foi consideravelmente reduzida (efeito vantajoso em termos de valores estéticos dos têxteis acabados). Ocorreu o aumento da alvura da fibra quando o tratamento enzimático foi realizado antes do alveijamento, devido ao aumento no grau de purificação da fibra das substâncias não-celulósicas, que resultou na diminuição considerável da rigidez flexural do fio, com a tenacidade restante do fio não alterada ou ligeiramente reduzida.

2.3.2. Bioestonagem

Heikinheimo *et al.* (2000) estudaram os efeitos de três celulasas monocomponentes purificadas cromatograficamente, EG I, EG II e CBH I e duas diferentes misturas de celulase produzidas por modificação genética da linhagem *Trichoderma reesei* (Ecostone® L – celulase comercial ácida com endo e exoatividade – e Celulase B – preparação de celulase experimental rica em CBH – doadas pela Röhm Enzyme Filand Oy), no processo de estonagem de tecidos denim. As celulasas purificadas de *Trichoderma reesei*, a EGI foi mais efetiva na remoção de cor do denim devido a um nível muito baixo de hidrólise, indicando uma ação direta no sítio desta enzima na parte colorida da celulose. A CBI não apresentou efeito de estonagem mesmo em elevadas dosagens de enzimas. A celulase comercial Ecostone L produziu um bom efeito de estonagem, mas a Celulase B foi capaz de remover cor apenas com elevadas dosagens de enzima, ou seja, quando a quantidade de EG na mistura é bastante elevada. Assim, para bons efeitos de estonagem é necessário que as celulasas sejam endoglucanases.

Belghith *et al.* (2001) produziram grandes quantidades de celulase em um fermentador com o *Penicillium occitanis* mutante hipercelulolítico Pol 6 do e avaliaram a conveniência destas celulases para o processo de bioestonagem. Concluíram que as celulases Pol 6 oferecem uma excelente alternativa para estonagem de jeans, com efeito, abrasivo uniforme e eficiência comparável à obtida pela celulase comercial.

2.3.2.1. Influência da Presença de Corantes no Tratamento Enzimático

Os tecidos tintos de algodão podem ser hidrolisados por celulases, 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.

Koo *et al.* (1994) investigaram a taxa de hidrólise catalítica de tecidos de algodão, mercerizados e não mercerizados, com corantes reativos, a cuba (tina) e direto. Testaram várias condições de tratamento enzimático, e usaram como parâmetros à resistência a ruptura, tingibilidade, solidez e aparência superficial. A hidrólise catalítica com a enzima celulase foi afetada pelos corantes, direto e reativo, absorvidos no substrato. O corante à tina, não mostrou ação inibitória sobre a reação catalítica da celulase. A perda de massa foi maior nos tecidos mercerizados que não mercerizados, devido à diminuição da cristalinidade do algodão pela mercerização. Ocorreu redução significativa na resistência à ruptura do tecido. A cor produzida nos tecidos tingidos foi menor que as amostras não tingidas, devido à diminuição das regiões amorfas onde as moléculas de corantes são absorvidas no substrato pelo tratamento. Concluíram que os tecidos tratados enzimaticamente e posteriormente tintos mostraram diferentes perfis de enfraquecimento de cor comparado aos tecidos não tratados depois de lavados.

Barcellos *et al.* (1999) pesquisaram a influência do tratamento com celulase antes e após o tingimento, pois ocorre o aumento e/ou diminuição na intensidade/tonalidade da cor. Concluíram que o tratamento com celulase interfere no tingimento prévio e posterior a esse tratamento, devido à remoção de grupos iônicos, induzidos durante alvejamento, ou remoção de microfibrilas, alterando a intensidade da cor.

Yamada *et al.* (2005) estudaram o efeito inibitório dos corantes reativos, no

tratamento enzimático de fibras de algodão com celulase comercial (atividade EG) e altamente purificada, celulase tipo exo (CBH I e CBH II) e celulase tipo endo (EG II), pela perda de massa, alterações morfológicas na superfície da fibra. A celulase EG II foi pouco influenciada pelos corantes ligados covalentemente à celulose, desde que esses corantes se dissociassem dos substratos livremente. Por outro lado, as celulases CBH I e CBH II foram afetadas pelos corantes mais que o tipo endo. A celulase tipo exo foi mais inibida que o tipo endo pelo tingimento no caso da atividade de sacarificação, sendo que a CBH I foi severamente inibida pelo tingimento quando comparado com CBH II ou EG II do ponto de vista das alterações morfológicas na superfície da fibra.

2.3.3. Estudo das Condições Operacionais do Tratamento Enzimático

Hartzell e Hsieh (1998) apresentaram os primeiros resultados da aplicação de diversos tipos de enzimas (lipase, protease, pectinase e celulase) em tecidos de algodão bruto e pré-tratado. Os ensaios realizados buscaram aumentar a umectabilidade, resistência e alvura. Verificaram que o tampão (fosfato de sódio para as enzimas pectinase, celulase e lipase e carbonato de sódio para enzima protease) utilizado, para cada enzima, não interfere na avaliação do efeito das enzimas. Provavelmente, a ineficiência das enzimas não-celulases no algodão bruto ocorreu devido à falta de acessibilidade dos componentes não celulósicos específicos das paredes celulares do algodão. As proteases parecem ser efetivas na remoção do material proteináceo no lúmen, mas não na superfície das proteínas. O pré-tratamento com água a 100°C realçou os efeitos da pectinase e celulase nos tecidos, mas não quando combinadas. A temperatura para a reação enzimática efetiva é extremamente abaixo daquelas usadas na purga alcalina, assim tendo vantagens significantes no consumo de energia.

Hsieh e Cram (1999) investigaram dez enzimas proteolíticas, disponíveis comercialmente como agentes de purga, para o algodão. Estudaram o uso de sistemas completamente aquoso e operação sob condições de reação mais brandas do que aquelas empregadas na purga alcalina, visando aumentar o comportamento de umectabilidade. Utilizaram amostras pré-tratadas com água a 100°C. Sob condições de reação ótima, o resultado do comportamento umectante do algodão purgado com protease foi similar ou superior ao com purga alcalina. A temperatura requerida variou entre 25°C-45°C e um tempo mínimo de 10 a 30 minutos, com pH variando entre 4,0-7,0. Quatro proteases produziram umectabilidade superior no algodão, e várias outras também aumentaram a umectabilidade,

mas em menor grau. Sob condições de reação ótima, o resultado do comportamento umectante do algodão, purgado com protease, é similar ou superior ao com purga alcalina.

Tzanov *et al.* (2001) investigaram um processo, para tecidos de algodão, utilizando purga enzimática, com pectinases ácidas e alcalinas; alveijamento com peróxido produzido enzimaticamente por glicose-oxidase durante a oxidação de glicose e o processo único de purga/alveijamento reutilizando o banho residual da desengomagem enzimática com amilase. Observaram que a pectinase alcalina apresentou desempenho similar à ácida, entretanto em concentração inferior, que é interessante do ponto de vista econômico. Foi necessária a utilização de surfactantes para atingir adequada remoção do material da fibra e tornar a estrutura têxtil acessível ao acabamento. O processo desengomagem/purga/ alveijamento enzimático em circuito fechado parece ser possível e economicamente atrativo.

Cortez *et al.* (2002) estudaram a aplicação de celulasas para aumento da estabilidade de tecidos celulósicos. Inicialmente estabeleceram as concentrações de celulase e o tempo de reação, para depois otimizarem as composições de celulasas utilizadas para aumentar a estabilidade dimensional e minimizar a perda de massa e tensão do tecido. Observaram que os tratamentos com baixos níveis de celulasas ricas em EG (1,0 a 5,0 mg/g) causaram excelente melhoria na estabilidade dimensional da extensão dos tecidos celulósicos. Parece que a relaxação do estresse pode ser alcançada mais efetivamente com a perda mínima de massa, pela maximização do número de quebra na cadeia pela EG, quando minimizada a contribuição de celobiohidrolase.

Sangwatanaroj *et al.* (2003) estudaram a purga cáustica e enzimática, com pectinase, lipase, protease e celulase, em tecidos de algodão. Verificaram, conforme estudos prévios, que a lipase, protease e celulase não foram efetivas na purga do algodão quando usadas individualmente, requerendo a combinação das mesmas. Quando a combinação continha celulase, realizaram duas etapas no processo de purga enzimática, devido à diferença de pH e temperatura das enzimas. A alvura do tecido purgado com pectinase foi a mesma que a obtida pela purga cáustica. Os tecidos purgados com a combinação lipase e protease e celulase produziram resultados ligeiramente diferentes que os tecidos purgados com pectinase e com purga cáustica, entretanto, todos os tecidos mostraram adequada absorção para água e corantes.

Para estudar os efeitos individuais e a interação entre os parâmetros do processo de biopurga (temperatura, pH e concentração de surfactante), nas fibras de algodão, com pectinase ácida, disponível comercialmente como Pectinase 062L (Biocatalyst), Calafell e Garriga, (2004), utilizaram análise de variância em dois níveis. A reação foi mais eficiente

quando utilizada alta relação de banho, mas sob condições ótimas de temperatura, pode ser utilizada baixa quantidade de enzima e relação de banho. O pH e o surfactante pareceram ser determinantes no desempenho ótimo da enzima, sob as condições estudadas.

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 minutos de tratamento foi insuficiente para realizar a purga efetiva, quando comparado com 60 e 90 minutos, apesar de 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.

Para melhorar as propriedades físico-mecânicas e proporcionar alta umectabilidade e absorvência de corante, Aly *et al.* (2004), submetem tecidos de algodão engomado a desengomagem com a enzima Kemyrase. Nestes tecidos foram realizadas: purga enzimática (Bioprep); biopolimento (Cellusoft L) e alveamento (Denilite) e agente redutor (glicose). Foram avaliadas as condições operacionais: dosagem de enzima, pH, temperatura, tempo e variedade do algodão da qual o tecido foi feito. Avaliaram a perda de massa, umectabilidade, resistência à tração, espessura, alvura e medida da solidez. Os autores verificaram que o tecido tratado enzimaticamente, na desengomagem, purga e alveamento, apresentaram características (umectabilidade, espessura, resistência à tração, perda de massa, alvura e absorvência de corante) comparáveis se não superiores aos tratamentos químicos empregados convencionalmente.

2.3.3.1. Influência da Agitação Mecânica e Tipo de Equipamento Utilizado no Tratamento Enzimático

A influência da agitação no processamento de têxteis com celulases contendo CBD, de diferentes famílias, foi testada por Azevedo *et al.* (2000). Purificaram a endoglucanase EG V (E.C. 3.2.1.4) de *Humicola insolens*, da Novo-Nordisk e CenA (E.C. 3.2.1.4) de *Cellulomonas fimi* preparada pela University of British Columbia, Vancouver, Canadá, para

hidrolisar os tecidos de algodão com diferentes níveis de agitação mecânica. Para tentar esclarecer o papel dos CBD foram realizados experimentos com o domínio da enzima removido. Também foram realizados ensaios de adsorção/dessorção para observar a reversibilidade da ligação das celulases pertencentes ao CBD das famílias I e II. Verificaram que a presença de CBD não foi essencial para a atividade EG com altos níveis de agitação mecânica, similar às condições de processo utilizado na indústria têxtil. EG V mostrou menor porcentagem de adsorção sob ambos os níveis de agitação. O processo de adsorção/dessorção das celulases foi elevado, devido aos altos níveis de agitação mecânica. A ligação de celulase com CBD da família I (EG V) foi mais reversível do que CBD da celulase da família II.

Alguns pesquisadores verificaram que a qualidade dos efeitos de acabamento da celulase nos tecidos celulósicos pode depender do tipo de maquinário. Cortez *et al.* (2001) usaram celulases bruta total (EG I, EG II, CB I e CB II), rica em EG (EG I e EG II) e rica em CBH (CBH I e CBH II) de *Trichoderma reesei* para confirmar as propriedades finais do tecido submetido ao processamento em dois equipamentos: tratado sob condições realísticas de processo na máquina jet e molinete. Foi perceptível e quantificável a diferença daquelas amostras de tecidos tratados usando as mesmas condições de temperatura, tempo, pH, concentração de enzima e relação de banho nos dois equipamentos. Verificaram que em todos os casos a medida de atividade da celulase são maiores no equipamento jet que no molinete, com base no aumento da agitação no primeiro. Atribuíram estas diferenças ao aumento na atividade aparente de EG relativa a CBH com a alta taxa de agitação no equipamento jet.

2.3.3.2. Influência do Pré-Tratamento na Acessibilidade da Enzima à Fibra

Csiszár *et al.* (1998) usaram celulase comercial ácida para investigar os efeitos do pré-tratamento enzimático nos fragmentos de sementes de algodão e também a remoção destes do tecido de algodão, após desengomagem enzimática com amilase. Esta celulase contém 108 U/mL de atividade celulase, 81 U/mL de atividade β -glucosidase, 72.500 EG U/mL de atividade β -(1,4)-endoglucanase e 12.800 U/mL de atividade xilanase. Foi observado que dependendo do tempo de tratamento e concentração da enzima, ocorreu perda de massa dos fragmentos de sementes num intervalo de 28,4–34,6%. A celulase hidrolisou as fibrilas ligadas aos fragmentos de sementes dos tecidos. Concluiu-se que o pré-tratamento com celulase antes da purga alcalina aumenta tanto a degradação dos fragmentos de sementes quanto a remoção dos tecidos de algodão desengomados.

Pere *et al.* (2001) estudaram o tratamento de fibras e fios de algodão, com celulasas monocomponentes, e diferentes pré-tratamentos nas fibras para aumentar a acessibilidade da enzima na fibra. Os tratamentos enzimáticos foram avaliados microscopicamente e pela análise dos efeitos das fibras tratadas na fiabilidade, uniformidade de fio, tenacidade e *pilling*. Concluíram que a limpeza prévia ao tratamento enzimático foi um método simples que aumentou a atividade hidrolítica de celulasas nas fibras de algodão. O pré-tratamento químico testado também aumentou a eficiência das celulasas na seguinte ordem: oxidação < tratamento alcalino *wash* < tratamento fortemente alcalino. O tratamento realizado nas fibras totais não realçou a processabilidade do algodão, embora tenha ocorrido alguma melhoria na fiabilidade e nas propriedades do fio.

Os fios tratados com celulasas resultaram na modificação das propriedades do fio cardado. O tratamento com EG aumentou a qualidade do fio como a diminuição de arrepiado e aumento na uniformidade. O efeito do *pilling* da EG é mais efetivo quando aplicado nos tecidos de algodão, mas o tratamento do fio para controle do *pilling* pode oferecer uma vantagem para superar os problemas encontrados com biocabamento de tecidos em malha. Em todos os casos a atividade endoglucanase foi melhor que a atividade celobiohidrolase para estas modificações.

Lin e Hsieh (2001) estudaram se as proteases (tripsina – E.C. 3.4.21.4, quimiotripsina – E.C. 3.4.21.1, subtilisina – E.C. 3.4.21.6) seriam agentes de purga efetivo quando empregados diretamente nos tecidos de algodão bruto sem pré-tratamento com água quente. Observaram que todas as proteases melhoraram a umectabilidade do tecido a um nível similar à purga alcalina sob condições brandas. As condições de reação para alcançar a umectabilidade ótima para tripsina foram 5 g/L a 45°C, para subtilisina 5 mL/L a 55°C e para quimiotripsina 1 g/L a 55°C, 2 g/L a 45°C e 5 g/L a 35°C, durante 30 minutos, para todas as enzimas. Concluíram que as proteases são capazes de acessar a superfície das proteínas sem o pré-tratamento alterando a superfície das ceras favorecendo a remoção dos compostos hidrofóbicos da superfície. A eliminação do pré-tratamento com água quente e posterior lavagem do tampão é claramente vantajoso pela perspectiva de recuperação química e de energia. Essa purga melhorou a umectabilidade do tecido no mesmo nível que a purga alcalina, e similarmente melhorou as propriedades de perda de tensão. A vantagem dessa purga é que não adiciona alteração na superfície de atrito e resulta em menor encolhimento lateral. Entretanto, produziu um leve amarelado no tecido. Considerando que as condições operacionais para a aplicação de enzimas são alteradas quando existe ou não pré-tratamento, Hsie e Cram (1999) e Lin e Hsieh (2001) compararam a purga com protease, de algodão pré-

tratado com água quente e a purga direta com a enzima. Observaram que a purga de algodão com protease pré-tratado e com água quente em relação à purga direta exigiu um aumento na concentração (subtilisina), alta temperatura (subtilisina e quimiotripsina) ou longo tempo (tripsina e quimiotripsina) para encontrar umectabilidade e absorção similar.

2.3.3.3. Efeito do Surfactante

Para a celulase, o uso de surfactante oferece umectabilidade, conduzindo o substrato ao contato íntimo com as enzimas e permitindo às enzimas alcançarem diferentes lugares inacessíveis. Mizutani *et al.* (2002) estudaram o efeito do surfactante, monolaurato sorbitano polioxietileno, conhecido como Tween 20 (Aldrich), na hidrólise enzimática com celulase, de *Trichoderma reesei*, de diferentes fibras celulósicas e relacionaram à estrutura da fibra de celulose. Verificaram que o surfactante aumenta a formação de açúcar dos materiais celulósicos cristalinos tais como Avicel, algodão e Tencel. A formação de açúcares redutores relacionou-se inversamente à cristalinidade das celuloses, mas o grau que esta sacarificação foi elevada pela presença do surfactante foi diretamente relacionado à sua cristalinidade. Embora a inclusão do surfactante tenha elevado a sacarificação de celulose, a redução não foi superior à resistência à tensão ocasionada pela celulase utilizada sozinha. O elevado efeito de sacarificação pelo surfactante foi atribuído à inibição da sorção não produtiva da endoglucanase na superfície da celulose, que dá importante acesso à cadeia terminal de celulose pela exoglucanase.

O efeito desejado pelo processo de purga enzimática depende da natureza do substrato, tipo de enzimas, complexo enzimático ou um componente específico, atividade enzimática, uso de tensoativos e agitação mecânica. A combinação da pectinase com celulase permitiram reduzir a quantidade de enzima utilizada para obter a característica de umectabilidade pelo descruze 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. Isto pode ser observado pela análise da estrutura das camadas da fibra do algodão, composição da enzima e modo de ação na estrutura. 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 pécicas para a ação das pectinases (PACHECO, 2001).

Tensoativos são compostos anfifílicos, orgânicos ou organometálicos que formam colóides ou micelas em solução. Substâncias anfifílicas ou anfílicas são moléculas possuidoras de regiões distintas e características como hidrofóbicas e hidrofílicas. Os tensoativos causam influência na atuação das enzimas.

Os tensoativos não-iônicos são compatíveis com as enzimas pectinase P9179 e celulase C1184, pois não interferem na sua estrutura tridimensional. Para incrementar a atividade da celulase foi aumentada a concentração de quase todos os não-iônicos. Os tensoativos catiônicos podem dar algum incremento na atividade em baixa concentração, mas os aniônicos sempre atuam como inibidores (MANIASSO, 2001; PACHECO, 2001).

2.3.3.4. Tempo de Processo

Buscando minimizar o tempo de incubação enzimático requerido no processo de biopurga contínuo, Lenting *et al.* (2002), investigaram como e sob quais condições, o tempo de incubação da enzima BioPrep 3000L, da Novozymes, influenciaria o tempo de processo, e ainda, avaliar 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 surfactante relativamente altas. Tempo de incubação relativamente longo, 30 a 60 minutos, como frequentemente descritos na literatura, não são necessários, entretanto, tempo de incubação curto não remove toda a pectina. O restante da pectina nas fibras teria um efeito na massa do tecido, ou seja, a perda de massa é menor depois do processamento. A capacidade de absorção de água do tecido melhorou como consequência desse residual de pectina amorfa.

2.3.4. Influência de Agentes Químicos na Atividade de Xilanases – Inibição ou Ativação

A aplicação de enzimas em processos industriais requer o estudo da viabilidade técnica e econômica para sua produção em escala industrial. Estudos com diferentes fontes de carbono a fim de selecionar o tipo de fonte capaz de produzir maior quantidade de enzimas desejadas, além do estudo das propriedades catalíticas, como estabilidade térmica e influência da presença de compostos orgânicos ou íons, sobre a atividade, são os objetivos de muitos trabalhos. A seguir serão abordados alguns trabalhos relevantes para a produção, caracterização e aplicação de xilanase proveniente de fungos e bactérias.

Beg *et al.* (2000) estudaram a produção e caracterização de xilanase e pectinase termoestável de *Streptomyces* sp. QG-11-3. Estas enzimas foram parcialmente purificadas e testadas com alguns compostos químicos e íons metálicos para avaliar se estes as influenciariam de forma indutora (aumentando a atividade) ou inibitório (diminuição da atividade) na atividade. A atividade ótima, para ambas enzimas, ocorre a 60°C e o pH ótimo, para xilanase e pectinase, em 8,6 e 3,0, respectivamente. As enzimas se mantiveram 100% estáveis a 50°C acima de 24 horas. O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), para xilanase foi determinado, a 70, 75 e 80°C, como sendo 90, 75 e 9 minutos, enquanto para a pectinase nestas mesmas temperaturas, foi 90, 53 e 7 minutos, respectivamente. O efeito da presença de íons na atividade da xilanase purificada é apresentado na Tabela 2.4, quanto ao efeito sobre a atividade da pectinase não são apresentados.

Damaso *et al.* (2002) produziram um nível elevado de xilanase livre de celulase com *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145, usando sabugo de milho como fonte de carbono. A composição do meio que proporcionasse maior produção com baixo custo foi determinado por meio de planejamento experimental. Testaram a influência da adição de íons e reagentes químicos (3 e 5 mM) na atividade do caldo bruto centrifugado, cujo efeitos são apresentados na Tabela 2.4. O pH ótimo da enzima foi determinado como 6,0 e temperatura ótima como 75°C. A enzima apresentou, a 50°C, tempo de meia-vida de 24 horas, a 60°C, manteve 50% da atividade inicial após 4 horas de incubação e a 70°C, perdeu mais que 80% de atividade após 1 hora. No teste de estabilidade à estocagem a -20°C, na ausência de qualquer agente estabilizante, ocorreu perda de 15-20% da atividade inicial nos primeiros 30 dias, mantendo-se estável, subsequentemente, por 5 meses.

Nascimento *et al.* (2002) produziram e caracterizaram a xilanase, quase exclusivamente celular e baixíssima atividade celulolítica, de *Streptomyces* sp. da linhagem AMT-3 isolada do solo do cerrado brasileiro. Esta xilanase apresentou atividade ótima no intervalo de temperatura, 55-65°C, e pH 6,0. Dentre os numerosos substratos testados (xilana de larchwood, farelo de trigo, gérmen de trigo, grão de cevada, sabugo de milho, resíduo de papel) para maximizar a produção de xilanase, nas condições: 30°C, pH 7,0, 150 rpm, 10 dias, verificaram que, em geral, o crescimento celular, na presença de 1% de substrato, ocorreu até o 2º e 3º dia, enquanto a xilanase foi detectada a partir do final da fase de crescimento celular, aumentando deste ponto em diante, obtendo as seguintes atividades: para xilana de lariço de madeira 70,0 U/mL, farelo de trigo 28,4 U/mL, gérmen de trigo 20,4 U/mL, grão de cevada 16,0 U/mL, sabugo de milho 9,1 U/mL, resíduo de papel 7,9 U/mL. A enzima manteve 50%

de atividade depois de 20 horas a 55°C. O efeito da presença de íons na atividade da xilanase é apresentado na Tabela 2.4. Concluíram que estas propriedades asseguram a aplicação biotecnológica desta enzima, composta de 4 isoformas, detectadas pela SDS-PAGE, duas acima de 600 kDa e duas com cerca de 240 e 170 kDa.

O uso de enzimas em escala industrial requer: produção de enzimas com alta atividade em curto tempo de fermentação, a baixo custo. Dentro deste contexto existem muitos trabalhos e dentre esses, o de Sá-Pereira *et al.* (2002) que conseguiram produzir cerca de 12 U/mL de xilanase, pH 6,0 e 50°C, em 18 horas de fermentação. A atividade ótima foi alcançada a 60°C e pH 6,0. Permaneceu totalmente estável a 60°C durante 3 horas e a 90°C, manteve 20% de atividade remanescente depois de 14 minutos. O efeito inibitório ou realçado dos íons na atividade da xilanase é apresentado na Tabela 2.4.

A xilanase purificada do *Fusarium proliferatum*, massa molecular 22.400 Da, 591 U/mg de proteína de atividade, temperatura ótima 55°C e pH ótimo 5,0-5,5, apresentou estabilidade total entre 30 a 55°C em pH 5,0 durante 30 minutos, entretanto a 60°C permaneceu com 22% atividade residual e a 70°C com 14% (SAHA, 2002). A influência de agentes químicos sob a atividade da xilanase é apresentada na Tabela 2.4.

Dentre os vários parâmetros estudados, por Ryan *et al.* (2003), da terceira xilanase (XynC) purificada, produzida pelo fungo *Penicillium capsulatum*, a caracterização dessa enzima com baixa massa molecular (22.000 Da) demonstrou atividade ótima em pH 3,8 e 48°C. A 50°C, apresentou tempo de meia-vida para pH 3,2 de 25,8 minutos e pH 4,0 de 39 minutos. Após 24 horas de incubação em pH 5,0 a 50°C, a enzima apresentou 52% de atividade remanescente. O efeito da adição de alguns sais de íons metálicos (monovalentes, divalentes e trivalentes) sobre a atividade da XynC é apresentado na Tabela 2.4.

A xilanase alcalina de *Bacillus halodurans* S7 (43.000 Da) apresentou temperatura ótima a 75°C em pH 9,0 e 70°C em pH 10. Após 4 horas de incubação a 60°C em pH 9,0, a enzima permaneceu totalmente estável, entretanto em pH 10, apresentou 45% da atividade original, quando foi incubada a 65°C, a enzima manteve 60% de atividade remanescente depois de 3 horas de incubação e não foi detectada atividade após 1 hora de incubação a pH 10. A influência de aditivos na atividade dessa enzima alcalina é mostrada na Tabela 2.4.

2.3.5. Estabilidade Térmica de Xilanases

A desnaturação de enzimas a temperaturas brandas, como 40°C ou 50°C, torna a sua

utilização inviável em processos industriais. Assim, para garantir que a enzima se mantenha estável durante o maior tempo possível e, em alguns casos, após o uso possibilite reuso, são empregados osmólitos, para conferir efeitos significativos na estabilidade térmica. Segundo Taravati *et al.* (2007) a estabilização por meio de aditivos é mais simples e barato que a estabilização por engenharia da proteína, com a vantagem adicional de que o agente estabilizante pode ser adicionado à solução protéica no momento desejado, por exemplo, durante a estocagem ou durante o processo térmico.

Os osmólitos são compostos orgânicos, hidrossolúveis, com baixa massa molecular, produzidos naturalmente tanto por microrganismos quanto por animais e vegetais, para proteger suas proteínas contra estresse ambiental, como pressão osmótica e temperaturas extremas (FERREIRA *et al.*, 2004; TARAVATI *et al.*, 2007).

São quimicamente classificados em: polióis (poliálcoois, álcoois poliidroxiílicos), como glicerol, sorbitol, xilitol; compostos nitrogenados (aminoácidos e seus derivados), como glutamato, prolina, glicina e carboidratos (açúcares), como sacarose, frutose, trealose, entre outros. Quando os osmólitos combatem os efeitos que solutos deletérios têm sobre as proteínas são denominados solutos neutralizantes e quando exercem pequenos efeitos sobre a função protéica são solutos compatíveis (FERREIRA *et al.*, 2004; VIANA *et al.*, 2005; TARAVATI *et al.*, 2007).

Os osmólitos alteram o microambiente da proteína, pela sua exclusão da superfície, resultando na formação de uma camada de hidratação, com moléculas de água, ao redor da proteína. Conforme a extensão da camada de hidratação, tem-se um conteúdo de energia envolvido para sua manutenção, ou seja, para mantê-las organizadas. O mecanismo de estabilização dos osmólitos envolve a alteração do conteúdo energético do estado nativo da proteína (N) e do desnaturado (D), ou seja, o deslocamento do equilíbrio de desnaturação entre o estado nativo (N) e desnaturado (D) da proteína no sentido estado N. Essa atuação dos osmólitos é denominada de efeito solvofóbico. Adicional a este efeito tem-se o efeito hidrofóbico, que pela presença do osmólito, gera o aumento da polaridade do solvente. Por estes aspectos, a utilização de osmólitos proporciona a elevação de temperatura acima da qual a proteína normalmente seria desnaturada (FERREIRA *et al.*, 2004; VIANA *et al.*, 2005; TARAVATI *et al.*, 2007).

Tabela 2.4. Efeito dos íons metálicos sobre a atividade da xilanase.

Organismo	<i>Streptomyces sp.</i> QG-11-3	<i>Streptomyces sp.</i> AMT- 3	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Penicillium</i> <i>capsulatum</i> (XynC)	<i>Bacillus circulans</i>	<i>Fusarium</i> <i>proliferatum</i> NRRL 26517
Controle	444,00 IU/mL	33,20 U/mL	-	-	0,93 IU/mg	1,10 U/mL
kDa	-	-	-	22,00±0,4	-	-
Ag ⁺	83,00	-	-	-	-	-
Fe ²⁺	84,00	16,00	201,00	-	-	-
Fe ³⁺	85,00	-	146,00	-	112,00	-
Na ⁺	-	107,50	-	-	-	-
Mn ²⁺	83,00	17,70	156,00	79,00	94,70	51,00±2
Ca ²⁺	107,00	92,10	74,00	63,00	97,00	107,00±3
Cr ³⁺	72,00	-	-	46,00	-	-
Co ²⁺	77,00	90,50	-	-	156,50	122,00±3
Cd ²⁺	72,00	-	-	36,00	-	-
Cu ²⁺	80,00	18,30	76,00	35,00	42,70	28,00±4
K ⁺	-	92,70	-	-	-	-
Ni ²⁺	87,00	-	-	-	-	-
Zn ²⁺	88,00	88,50	16,00	18,00	43,00	-
Ba ²⁺	84,00	-	152,00	74,00	40,40	-
Mg ²⁺	-	91,30	90,00	-	85,20	113,00±5
Pb ²⁺	80,00	-	-	-	-	-
EDTA	80,00	-	70,00	-	22,80	95,00±4
NH ₄ ⁺	98,00	-	115,00	-	-	-
Condições	55°C, pH 6,0, 60 minutos, λ=540 nm, tampão fosfato 50 mM, concentração dos íons 1 mM.	50°C, pH 5,0, tampão citrato-sódio, concentração dos íons 10 mM.	60°C, pH 6,0, 10 minutos, concentração dos íons 1 mM.	25°C, pH 5,0, 30 minutos, concentração dos íons 10 mM.	80°C, pH 4,0, 30 minutos, concentração dos íons 1 mM.	50°C, pH 5,5, 30 minutos, concentração dos íons 5 mM.
Referência	Beg <i>et al.</i> , 2000	Nascimento <i>et al.</i> , 2002	Sá-Pereira <i>et al.</i> , 2002	Ryan <i>et al.</i> , 2003	Heck <i>et al.</i> , 2006	Saha, 2002.

* Os íons testados eram cloretos ou sulfatos.

Continuação da Tabela 2.4.

Organismo	<i>Bacillus circulans</i> AB 16		<i>Aspergillus caespitosus</i>		<i>Thermomyces lanuginosus</i> IOC-4145s	
	Xyl A	Xyl B	Xyl I	Xyl II	3 mM	5 mM
Controle	72,16 IU/mL	33,95 IU/mL	55,20 U/mg	133,40 IU/mg	-	-
kDa	-	-	27,00	17,70	-	-
Fe ³⁺	-	-	-	-	96,00±01	78,00±02
Na ⁺	-	-	72,10	81,00	110,00±13	113,00±03
Mn ²⁺	83,28	94,28	-	-	-	-
Hg ²⁺	7,60	15,90	0,00	11,30	-	-
Ca ²⁺	85,00	71,60	28,60	91,30	95,00±05	89,00±04
Cr ³⁺	-	-	-	-	-	-
Co ²⁺	96,64	107,39	90,90	103,00	-	-
Cd ²⁺	106,15	92,40	-	-	-	-
Cu ²⁺	82,83	67,61	14,10	75,70	-	-
K ⁺	-	-	-	-	113,00±02	96,00±05
Ni ²⁺	71,57	87,75	-	-	-	-
Zn ²⁺	-	-	29,80	89,50	95,00±15	90,00±03
Ba ²⁺	-	-	51,50	89,00	98,00±06	88,00±03
Mg ²⁺	95,10	95,38	81,80	93,00	106,00±04	74,00±08
EDTA	-/	-	98,00	99,00	-	-
Condições	65°C, pH 7,0, 10 minutos, $\lambda=550$ nm, tampão fosfato 50 mM, concentração dos íons 1 mM.		55°C, pH 6,5, tampão MES 100 mM, concentração dos íons 1 mM.		75°C, pH 6,0, 3 minutos, $\lambda=540$ nm, íons 3 e 5 mM.	
Referência	Dhillon <i>et al.</i> , 2000		Sandrim <i>et al.</i> , 2005.		Damaso <i>et al.</i> , 2002	

* Os íons testados eram cloretos ou sulfatos.

A fim de avaliar a termoestabilidade da xilanase produzida pela linhagem SSBP de *Thermomyces lanuginosus*, Singh *et al.* (2000), compararam com outras oito linhagens diferentes. A linhagem SSBP permaneceu com 38% da atividade, a 100°C, depois de incubada durante 30 minutos, enquanto a linhagem ATCC 16455, ficou com 10% de atividade remanescente. O tempo de meia-vida, em pH 6,5, para as linhagens é apresentado na Tabela 2.5. O sorbitol e o glicerol foram testados em concentrações variando entre 10 e 50%, para aumentar a termoestabilidade da xilanase da linhagem *T. lanuginosus* após 6 horas de incubação a 70°C. Verificaram que com 50% de sorbitol a enzima manteve 100% de atividade remanescente enquanto com glicerol foi 90%. Sem a adição destes polióis a enzima ficou com 50%.

Tabela 2.5. Tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da β -xilanase da linhagem SSBP de *T. lanuginosus* em diferentes valores de pH.

Linhagem SSBP	pH	5,00	6,50	8,00	9,00	12,00
<i>T. lanuginosus</i>	6,50	$t_{1/2}$ (min)				
60°C	-	113,00	Estável	Estável	Estável	45,00
65°C	-	20,00	Estável	Estável	Estável	25,00
70°C	337	11,50	341,00	170,20	140,00	15,00
75°C	257	5,00	250,30	130,80	110,00	12,00
80°C	157	2,10	180,00	90,10	81,00	10,50
85°C	95	2,30	100,00	73,20	49,00	6,50
90°C	47	1,10	45,00	25,00	45,00	5,50
Ea (kJ/mol)		83,52	102,33	99,25	49,20	47,34

FONTE: SINGH *et al.*, 2000.

Zhi *et al.* (2007) investigaram o efeito da adição de surfactante (dioctila sulfosuccinato de sódio); carboidratos (glicose, frutose, galactose, trealose, entre outros) e polioliol (glicerina, polietileno glicol – PEG200), em tampão citrato 0,05 M, pH 5,0, na atividade e estabilidade térmica de cloroperoxidase (CPO) quando submetidos à incubação a 25, 40, 50 e 60°C. Observaram que a 25°C, a estabilidade aumentou com o aumento da concentração dos estabilizantes, depois de longo período de incubação (432 horas = 7,2 dias), entretanto a CPO foi quase destruída na presença de glicose 0,01 M e xilose 0,05 M, depois de 9 horas de incubação. A 40°C, a atividade é praticamente perdida na ausência de aditivos depois de 90 horas, porém com PEG200, 88,5% da atividade permanece preservada após 329 horas de incubação. A atividade da CPO, em tampão puro, foi praticamente perdida a 50°C,

nas primeiras 10 horas de incubação. A glicose, frutose e xilose não preservaram a enzima da desnaturação térmica. O PEG200 e glicerina, mantiveram aproximadamente 30% da atividade remanescente em 50 horas para as concentrações testadas (0,01; 0,05; 0,1 e 0,2 M) e manteve 13% depois de 192 horas de incubação. A 60°C, a enzima perdeu completamente a atividade, na ausência de aditivos, em 50 minutos. Concluíram que o uso de aditivos possibilita o uso da CPO em processos industriais com condições operacionais extremas.

Xilanase de *Thermomonospora* sp. com 125 IU/mL de atividade foi produzida em culturas agitadas, após 96 horas de incubação a 50°C e pH 9,0. As condições ótimas de temperatura e pH foram determinadas a 70°C e 7,0, respectivamente. O tempo de meia-vida a 60°C foi 8 horas; 70°C, 4 horas e a 80°C somente 9 minutos. Para melhorar a estabilidade a 80°C, foram adicionados polióis, na proporção: número de grupos hidroxila por molécula de polioliol. A adição de alanina (0,5 M), cisteína (10 mM), β -mercaptoetanol (10 mM) e Tween 80 (0,1 %) não impediram a perda de atividade a 80°C, bem como a adição dos íons, na concentração final de 10 mM, CoCl₂, CaCl₂, KCl e NaCl. O sorbitol manteve a proteção máxima na concentração de 4 M. A adição de 2 M de glicina à solução de xilanase a 80°C aumentou o tempo de meia-vida de 8 para 22 minutos. Portanto o efeito termoestabilizante do polioliol foi proporcional ao tamanho molecular, ou seja, pode ser correlacionado ao número de grupos hidroxila por molécula de polioliol. Na cultura depois de filtrada, foi identificada a presença de celulase (23 IU/mL), manase (1 IU/mL) e β -xilosidase (0,1 IU/mL) (GEORGE *et al.*, 2001).

Lemos *et al.* (2000) efetuaram o estudo da endoxilanase (30 IU/mL) e β -xilosidase (1,3 IU/mL) produzida, extracelularmente, pelo *Aspergillus awamori*. Ainda avaliaram o efeito de polióis na estabilidade da endoxilanase. Verificaram que todos os polióis testados apresentaram efeito positivo sobre a desnaturação térmica, sendo que o sorbitol e o xilitol, ambos com concentração final de 2 M, manteve 100% da atividade da endoxilanase depois de 270 minutos de pré-incubação a 50°C, sendo a atividade residual determinada a 60°C. Com base nestes resultados, o caldo bruto foi incubado, na presença de xilitol e sorbitol, 2 M, durante 300 minutos a 52°C, no qual a atividade, para ambos os estabilizantes, após este tempo de incubação se mantiveram aproximadamente 60%, enquanto o controle foi inferior a 20%. No teste de estocagem a baixa temperatura (-4°C) durante 165 dias, observaram que a atividade da endoxilanase permaneceu estável (100%) enquanto a β -xilosidase sofreu redução na atividade de 20% durante os primeiros 15 dias, e no final (165 dias) manteve 75% da atividade inicial.

Cobos e Estrada (2003) relatam o efeito de polióis na termoestabilidade e atividade da xilanase de *Trichoderma reesei* QM 9414, com massa molecular de 20 kDa, produzidas pela indução com palha de trigo, como única fonte de carbono. Determinaram a estabilidade térmica da xilanase alcalina, purificada, com e sem a adição de polióis. Observaram que a energia de ativação da inativação da xilanase foi 311 kJ/mol. A 60°C o tempo de meia-vida sem poliol foi de 2,7 minutos e na presença de 2M de eritritol, xilitol e sorbitol verificaram que o tempo aumentou 8, 32 e 112 vezes, respectivamente. A xilanase apresentou 80% de atividade residual após 19 horas de incubação a 60°C. Concluíram que os polióis estabilizam a xilanase considerando os seguintes aspectos: a estabilização aumenta parabolicamente com o número de hidroxilas do poliol bem como a concentração do poliol correspondente é aumentado.

A partir do levantamento de trabalhos relevantes na aplicação de enzimas em processos industriais, especificamente têxteis, pôde-se verificar uma grande lacuna na determinação das melhores condições operacionais da ação combinada de enzimas no pré-tratamento de tecidos de algodão – biopurga. A relevância dos objetivos do presente trabalho pode ser identificada nos desafios de contribuir na determinação da viabilidade técnica da utilização de xilanase, obtida a partir da fermentação da xilana de bétula, em caldo bruto, na biopurga de tecidos de malha de algodão, rota que tradicionalmente é empregada na indústria de celulose e papel; na determinação das melhores condições operacionais do processo de purga enzimática utilizando enzimas individuais e de *pool* enzimático comerciais que contém xilanase, do estudo de diferentes estabilizantes para prolongar a atividade enzimática da xilanase visando aumentar a eficiência da biopurga e o reuso do banho enzimático; e da comprovação do efeito da xilanase de forma individualizada, na biopurga.

No próximo capítulo serão apresentadas e discutidas as metodologias utilizadas no presente trabalho.

CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo será apresentada a descrição dos procedimentos experimentais utilizados nos processos de purga alcalina e enzimática, e de 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 SENAI – Brusque. Foram realizados experimentos para avaliar os efeitos da concentração enzimática e tempo de processo, sobre a qualidade final do substrato têxtil.

3.1. MATERIAL

3.1.1. Enzimas

Foi utilizada a preparação comercial, gentilmente doada pela Novozymes, Pulpzyme HC com atividade xilanolítica e a xilanase em caldo bruto fermentativo, centrifugado, de *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 (Duarte *et al.*, 2000), do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA da UNICAMP. A descrição do método de cultivo para obtenção da enzima está descrito no Apêndice B. A preparação comercial Pulpzyme HC é obtida do *Bacillus sp.* geneticamente modificado. A Tabela 3.1 apresenta as características das enzimas utilizadas neste trabalho.

3.1.2. Substrato Têxtil

Foram utilizados tecidos de malha de fio cardado 100% algodão, com título do fio da malha 30/1. As amostras de tecidos de malha utilizados como corpos de prova nos ensaios tinham aproximadamente 10 g e foram provenientes de um único lote, doados pelo SENAI – Blumenau/SC, garantindo a padronização dos corpos de prova, quanto ao tipo de fio, gramatura e substâncias hidrofóbicas. O grau de branco, hidrofiliidade e perda de massa dos

corpos de prova dos ensaios de purga alcalina foram utilizados como referência para os corpos de prova da purga enzimática.

Tabela 3.1. Características das enzimas utilizadas no trabalho.

Enzima	Caldo bruto centrifugado	Pulpzyme HC
Origem/Fonte	<i>Bacillus pumilus</i> CBMAI 0008	<i>Bacillus sp.</i>
pH ótimo	9,0 (7,0-8,5)	7,0-9,0
Temperatura ótima (°C)	60	50-75
Componentes presentes	Endo- β -(1,4)-xilanase	Multicomponente com atividade principal endo- β -(1,4)-xilanase.
Enzyme Commission (E.C.)*	EC 3.2.1.8 criada em 1961	
Outros nomes*	Endo- β -(1,4)-xilanase, β -(1,4)-xilana 4-xilanolhidrolase; endo-(1,4)-xilanase; xilanase; β -(1,4)-xilanase; endo-(1,4)-xilanase; endo- β -(1,4)-xilanase; endo- β -(1,4)-D-xilanase; β -(1,4)-xilana xilanolhidrolase; β -xilanase; β -(1,4)-xilana xilanolhidrolase; endo- β -(1,4)-xilanase; β -D-xilanase	
Nome sistemático*	β -(1,4)-D-xilana xilanolhidrolase	
Reação*	Endohidrólise de ligações β -(1,4)-D-xilosídicas em xilanase	

*FONTE: NC-IUBMB, 2006.

3.1.3. Reagentes

Os reagentes utilizados foram ácido acético, ácido clorídrico, ácido 3,5 dinitrosalisílico (DNS), álcool etílico, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, carboximetilcelulose, corante Comassie Brilliant Blue G-250 e CBR-250, fenol, fosfato de sódio dibásico, fosfato de sódio monobásico, glicerol, glicina, hidróxido de sódio, metabissulfito de sódio, metanol, sorbitol, soro albumina bovina (BSA), tartarato duplo de sódio e potássio, xilana de bétula (*birchwood*), xilitol, xilose. Os reagentes utilizados foram de grau analítico P.A. e usados sem prévios tratamentos. Os produtos químicos utilizados nos processos de purga convencional e enzimática estão descritos na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Características dos produtos químicos utilizados nos processos de purga convencional e enzimática.

Produto*	Aplicação	Caráter químico	Caráter iônico	Quantidade sugerida
Fongralen* M líquido	Agente emulsificante para parafina, óleos vegetais e minerais para o tratamento prévio de materiais têxteis.	Composto de tensoativos; contém solvente orgânico	Não iônico	1 a 2 g/L
Sandozin* SNP.BR líquido	Agente umectante, de lavagem, isenta de alquilfenol etoxilado (APEO), silicones e solventes orgânicos, para todos os tipos de fibras têxteis.	Composto à base de álcoois alifáticos etoxilados	Não iônico	0,5 a 5,0 mL/L 1 a 5 g/L
Sirrix ® CV líquido	Produto especial de ação polivalente, para o tratamento de materiais têxteis com propriedade desmineralizante, dispersante, sequestrante, estabilizadora, anticatalítica para peróxido.	Mistura sinérgica de sais orgânicos e inorgânicos	Aniônico	1,0 a 5,0 mL/L

* Marca: Clariant

3.1.4. Equipamentos

Foram utilizados, para medir o pH, o pHmetro modelo 400M2, marca Quimis; para pesar os reagentes a balança semi-analítica modelo MARK 500 e a balança analítica modelo AB204-S, marca Mettler – Toledo; para os ensaios colorimétricos o espectrofotômetro modelo UV mini 1240, marca Shimadzu; espectrofotômetro de remissão; para os ensaios de biopurga, alveamento e tingimento, o aparelho de laboratório para tingimento até 135°C ALT-B 9306, com microprocessador Datex Pico II; marca Mathis. Para as dosagens de atividade enzimática foi utilizado o banho termostatizado modelo 550, marca Fisatom; banho termostatizado modelo Dubnoff DI 951, marca Dist. Para a determinação de perda de massa foi utilizada a estufa de circulação de ar MA 035, marca Marconi e para a determinação do grau de branco o espectrofotômetro de re-emissão com lâmpada padrão, modelo MS-1500 Plus, marca Macbeth.

3.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.2.1. Caracterização dos Corpos de Prova

Os corpos de prova (amostras de malha de fio cardado 100% algodão) sem tratamento e tratados, com o processo enzimático e alcalino, foram caracterizadas quanto à hidrofiliidade (absorção de água), brancura e perda de massa. Todos os corpos de prova possuíam aproximadamente 10 g devido a relação de banho (1:10) utilizada nos ensaios.

3.2.1.1. Grau de Branco ou Grau de Alvura

O grau de branco foi determinado nos corpos de prova submetidos ao processo de biopurga e purga alcalina, com um espectrofotômetro de re-emissão com lâmpada padrão, modelo MS-1500 Plus, marca Macbeth, usando cerâmica branca como padrão de calibração.

3.2.1.2. Hidrofiliidade

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

3.2.1.3. Perda de Massa

A perda de massa foi calculada pelas 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. Este parâmetro também foi utilizado para o estudo da taxa de hidrólise enzimática. A equação (3.1) foi utilizada para o cálculo da perda de massa percentual (ALY *et al.*, 2004):

$$\text{perda de massa (\%)} = \left[\frac{(m_1 - m_2)}{m_1} \right] * 100 \quad (3.1)$$

onde:

$m1$ = massa do corpo de prova antes do tratamento;

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

3.2.1.4. Reprodutibilidade

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram reprodutíveis.

3.2.2. Caracterização das Preparações Enzimáticas

3.2.2.1. Determinação das Proteínas

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

3.2.2.2. Determinação da Atividade Enzimática

3.2.2.2.1. Determinação da curva padrão de glicose e de xilose

A curva padrão para a determinação da atividade da celulase foi construída com solução de glicose, nas concentrações de 0,5 a 2,0 $\mu\text{M}/\text{mL}$ e para a xilanase a curva padrão foi construída com solução de xilose, variando as concentrações de 0,5 a 10 $\mu\text{M}/\text{mL}$.

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

3.2.2.2.2. Determinação da atividade xilanolítica

A determinação da atividade xilanolítica foi realizada pela quantificação de açúcares

redutores totais (Miller, 1959), usando xilose como padrão, liberados a partir de xilana de bétula (*birchwood*), segundo o método de BAILEY *et al.* (1992). O método consistiu na pré-incubação, durante 5 minutos, de 0,9 mL de solução de xilana 1%, dissolvida em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M a 50°C. Após esse período adicionou-se 0,1 mL de enzima e essa mistura foi mantida sob incubação durante 5 minutos. Em seguida foi adicionada a cada mistura reacional 1,5 mL de solução de DNS e os tubos foram fervidos durante 5 minutos. A seguir os tubos foram colocados em banho de gelo. As leituras espectrofotométricas no espectrofotômetro modelo UV mini 1240, marca Shimadzu foram realizadas a 540 nm, utilizando-se uma curva padrão de xilose. Em cada ensaio de determinação de atividade, o espectrofotômetro, foi calibrado, com o denominado branco do aparelho, que consistiu na substituição da solução de enzima pelo tampão. Para determinar a presença de açúcares na solução de enzima, denominada branco de enzima, foi substituído a solução de xilana 1% por solução tampão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade da enzima, capaz de hidrolisar a liberação de 1 μmol de açúcares redutores (xilosacarídeos) por minuto, expresso por μmol de xilose/(mL.min). A atividade xilanólítica foi determinada pela equação (3.2), expressa em U/mL, a 50°C.

$$\left[\frac{U}{\text{mL}} \right] = \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL} * \text{min}} \right] = \frac{C * D * V_t}{V_e * t} \quad (3.2)$$

onde:

C = concentração de xilose liberada [$\mu\text{mol}/\text{mL}$];

D = diluição utilizada;

V_e = volume da solução de enzima [mL];

V_t = volume total da solução [mL];

t = tempo de incubação ou reação [minutos].

3.2.2.2.3. Determinação da atividade celulolítica

A degradação do polímero de celulose pode ser realizada pela ação de uma das enzimas multicomponentes (EG, CBH e βG) 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), com glicose como padrão. Para eliminar os interferentes gerados durante a reação com o substrato, foram realizadas

simultaneamente provas em branco.

A atividade celulolítica da endo β -(1,4)-glucanase ou carboximetilcelulase – CMCase – Cx foi determinada, utilizando solução de carboximetilcelulose 2% (massa/volume), em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, segundo o método de Ghose (1987). A solução de substrato foi pré-aquecida durante 5 minutos. A mistura da reação foi composta de 0,9 mL de substrato e 0,1 mL de enzima. Incubou-se a mistura, sob agitação, a $50 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 30 minutos. Após o tempo de incubação, adicionou-se 1,5 mL do reagente DNS e submeteu-se à temperatura de ebulição, durante 5 minutos. A seguir os tubos foram colocados em banho de gelo. Após o resfriamento foram adicionados 2 mL de água destilada e realizada a leitura de absorbância no comprimento de onda 540 nm, usando glicose como padrão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade da enzima, capaz de hidrolisar a liberação de 1 μmol de açúcares redutores (glicosarídeos) por minuto, expresso por μmol de glicose/(mL.min). A atividade celulolítica foi determinada pela equação (3.3), expressa em U/mL, nas condições experimentais, a 50°C .

$$\left[\frac{U}{\text{mL}} \right] = \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL} * \text{min}} \right] = \frac{V_t * C * D}{V_e * t} \quad (3.3)$$

onde:

C = concentração de glicose liberada [$\mu\text{mol}/\text{mL}$];

D = diluição utilizada;

V_e = volume de solução de enzima [mL];

V_t = volume total da solução [mL];

t = tempo de incubação ou reação [minutos].

3.2.2.3. SDS-PAGE

Foi realizada a eletroforese contínua desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), usando o gel de corrida a 10% e o gel de concentração 5%, conforme Laemmli (1970). O padrão de massa molecular usado como marcador foi 6,5 a 200 kDa (SDS-PAGE SERVA) e as bandas foram evidenciadas com coomassie brilliant blue. O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de Bradford usando soro albumina bovina (BSA), fração V (Sigma, USA) como padrão.

3.3. PROPRIEDADES CATALÍTICAS DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS

O caldo bruto centrifugado de *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 foi caracterizado quanto à atividade em função da temperatura. A estabilidade térmica do caldo bruto, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, foi determinado no mesmo intervalo de temperatura que os ensaios de atividade em função da temperatura. Foram realizados testes para avaliação do efeito de estabilizantes, íons e agentes tensoativos, sobre a atividade enzimática remanescente. Após a estabilização da enzima foram realizados ensaios cinéticos nas malhas 100% algodão.

Para a Pulpzyme HC, foram realizados ensaios de estabilidade e os ensaios cinéticos como padrão uma vez que essa enzima é preparação enzimática.

3.3.1. Influência da Temperatura na Atividade Enzimática

A influência da temperatura sobre a atividade enzimática das enzimas estudadas (caldo bruto e preparação enzimática) foi avaliada no intervalo de 40-90°C, no pH 8,0 (mistura de soluções de carbonato de sódio e bicarbonato de sódio, 0,1 M, aqui denominado “solução tampão carbonato-bicarbonato”) e 9,0 (solução tampão glicina-NaOH, 0,1 M), conforme metodologia descrita no item 3.2.2.2. O caldo bruto foi caracterizado por Duarte *et al.* (2000) como alcalina (pH 8-11), com atividade ótima em pH 9,0. Deve-se considerar que o uso de pH superior a este, em processos industriais, requereria quantidade elevada de agente alcalino como soda ou barrilha.

3.3.2. Desnaturação Enzimática

A velocidade de uma reação pode ser aumentada de duas formas: com o aumento da temperatura ou diminuição da energia de ativação. Entretanto, no caso das enzimas, que são constituídas de proteínas, o aumento de temperatura promove a desnaturação térmica, ocasionando a queda abrupta da velocidade de reação, quando temperaturas acima da temperatura de desnaturação são empregadas (VOET e VOET, 2006).

Com os dados de atividade em função da temperatura é possível determinar a energia de ativação da reação enzimática, pela modificação na equação de Arrhenius, equação (3.3),

onde se substitui a velocidade inicial da reação (v) pela atividade específica da enzima (Ae), equação (3.4a), a seguir grafica-se $\ln(Ae)$ em função de $(1/T)$.

$$v = k e^{-\left(\frac{Ea}{RT}\right)} \quad (3.4)$$

$$\ln Ae = \ln k - \left(\frac{Ea}{R}\right)\left(\frac{1}{T}\right) \quad (3.4a)$$

onde:

Ae = atividade enzimática da enzima [U/min];

Ea = energia de ativação [cal/mol];

k = constante de Arrhenius [$\mu\text{mol}/\text{min}$] ou [U/min];

R = constante da lei dos gases = 1,987 [cal/mol K];

T = temperatura absoluta [K].

v = velocidade inicial da reação [$\mu\text{mol}/\text{min}$];

A estabilidade térmica das enzimas foi testada em solução tampão fosfato pH 8,0 e solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, para avaliar a estabilidade térmica das enzimas, pela constante de desnaturação, energia de ativação e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$, min). Conforme citado por Voet (2006), utilizou-se para determinar a constante de desativação (k_d , h^{-1}) das enzimas, a equação 3.5:

$$\ln At_{residual} = \ln At_{inicial} - k_d t \quad (3.5)$$

onde:

$At_{residual}$ = atividade enzimática remanescente após o tratamento térmico durante um período de incubação [U/mL];

$At_{inicial}$ = atividade enzimática inicial [U/mL];

t = tempo de incubação [min].

O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) corresponde ao tempo necessário para que ocorra a redução de 50% da atividade inicial da enzima, e pode ser calculado pela equação (3.6), onde k_d é a constante de desativação térmica ou desnaturação da enzima, em uma determinada temperatura expressa em minuto^{-1} .

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_d} \quad (3.6)$$

3.3.3. Efeito do Tipo de Tampão e Estabilizantes

Para melhorar a estabilidade térmica do caldo bruto da xilanase de *B. pumilus* CBMAI 0008, antes de utilizá-lo em diferentes condições de ajuste de pH, foi adicionado a este os seguintes polióis: glicerol (marca Amresco), sorbitol e xilitol (marca Acros Organics). Os ensaios foram realizados conforme o planejamento experimental descrito no item 3.4. A mistura de 1 mL de caldo bruto centrifugado e 3 mL de estabilizante diluído nas soluções tampão glicina-NaOH, 0,1 M, mistura carbonato-bicarbonato de sódio, 0,1 M, e NaOH, com pH ajustado em 9,00, e água destilada, com pH aproximadamente 6,00, foi submetida, na ausência de substrato, a 50°C durante 60 minutos. Após serem retiradas do banho as amostras foram resfriadas em banho de gelo e armazenadas sob refrigeração para posterior determinação da atividade remanescente, conforme o método descrito no item 3.2.2.2.2. A concentração de polióis utilizada foi 1 M e a concentração desses não foi corrigida para o ensaio de atividade, pois o objetivo da sua incorporação era conferir estabilidade durante o período de incubação.

Este mesmo procedimento foi utilizado para avaliar a influência da concentração de estabilizante utilizado (0,5, 1,0 e 2,0 M) e também para a determinação das condições ótimas para aplicação na biopurga. O planejamento experimental utilizado para cada grupo de parâmetros estudados é apresentado no planejamento experimental descrito no item 3.4.

3.3.4. Efeito de Inibição e Ativação na Atividade Enzimática

Foram verificadas, na literatura, várias formas para avaliar a influência de inibição ou ativação pela adição de aditivos (íons, agentes químicos e sequestrante) sobre a atividade da enzima: numa os aditivos são adicionados ao caldo enzimático e então se procede à determinação da atividade residual sob as condições experimentais (Christakopoulos *et al.*, 1999), em outra enzima com o aditivo é submetido à pré-incubação por um dado período, na ausência ou presença de substrato, posteriormente determina-se a atividade remanescente, na mesma concentração de íons, neste caso, o objetivo também é avaliar a estabilidade da enzima (Burhan *et al.*, 2003; Ryan *et al.*, 2003; Heck *et al.*, 2006); ainda verificou-se uma na qual os íons são adicionados à enzima, junto ao substrato, gerando concentração final desse íon na reação, por exemplo, 3, 5 ou 10 mM (SÁ-PEREIRA *et al.*, 2002; NASCIMENTO *et al.*, 2002).

Assim, para testar o efeito da concentração de íons sobre a atividade da enzima, realizou-se a adição dos íons à enzima, e mediu-se a atividade com a correção da concentração de íons, para obter a concentração final dos íons na reação enzimática, 5 mM (0,005 M). A determinação da atividade foi realizada conforme o método descrito no item 3.2.2.2.2.

3.3.5. Efeito de Agentes Tensoativos

Para avaliar a estabilidade do caldo bruto na presença dos agentes tensoativos, umectante e emulsificante, utilizado na purga, enzimática e alcalina, da malha 100% algodão, foram incubados 75 U de caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, com os agentes umectantes segundo as concentrações indicadas no planejamento experimental, totalizando 10 mL de solução final, em função da relação de banho (RB) 1:10 – 10 mL de banho para cada grama de tecido. Foi adicionada uma esfera de aço em cada tubo (20 mL) e esses foram submetidos a 40 rpm de agitação, 50°C durante 60 minutos, na presença de substrato xilana *birchwood* 1%, usado como substrato modelo. O uso de substrato modelo pode ser similar ao efeito esperado no substrato desejado, no caso desse estudo os fragmentos de capulho e ramos, conhecidos como piolhos (Csiszár *et al.*, 2006). Após serem retiradas do banho as amostras foram resfriadas em banho de gelo e armazenadas sob refrigeração para posterior determinação da atividade remanescente conforme o método descrito no item 3.2.2.2.2. Para a medição de atividade, foi realizada a correção da concentração dos tensoativos, conforme indicado no planejamento experimental apresentado no item 3.4. Os tubos foram submetidos de forma independente, em triplicata, com triplicata de branco.

3.4. PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO

A Tabela 3.3 apresenta os níveis dos parâmetros estudados no planejamento experimental para avaliar a melhor combinação entre solução tampão e estabilizante sobre a estabilidade do caldo bruto centrifugado e a Tabela 3.4 apresenta o planejamento experimental. Para comprovar os efeitos do pH e composição da solução tampão sobre a

atividade enzimática, foi testada água destilada sem correção de pH e as possíveis substâncias que poderiam ser utilizadas pela indústria têxtil para a alcalinização, como NaOH e barrilha. Portanto, foi testado o NaOH e para reproduzir a barrilha foi usado uma mistura entre carbonato-bicarbonato de sódio. A solução tampão glicina-NaOH foi usada no planejamento como condição ideal.

Tabela 3.3. Níveis dos parâmetros usados para a determinação da melhor combinação tipo de solução tampão/estabilizante sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado.

Fator	Solução tampão	Fator	Estabilizante (1 M)
1	Água	A	Glicerol
2	Carbonato-Bicarbonato de Sódio ^{b,c}	B	Sorbitol
3	Glicina-NaOH ^{b,c}	C	Xilitol
4	NaOH ^b	D	Ausente

^a pH 6,05; ^b pH 9,0, ^c 0,1 M.

Tabela 3.4. Planejamento fatorial 2⁴, com duas replicatas, para a determinação da melhor combinação tipo de solução tampão/estabilizante sobre a atividade remanescente (%) para o caldo bruto centrifugado.

Ensaio	Combinação	Ensaio	Combinação	Ensaio	Combinação
1	3D	17	1B	33	2A
2	4B	18	2B	34	1D
3	4B	19	1C	35	4D
4	2C	20	4D	36	4A
5	1C	21	4C	37	4B
6	1A	22	1A	38	4A
7	2A	23	3A	39	3C
8	2B	24	1B	40	1C
9	3C	25	2D	41	1B
10	3B	26	4D	42	2C
11	2D	27	3C	43	1D
12	3A	28	3D	44	1D
13	2A	29	4C	45	2D
14	4A	30	3B	46	3D
15	2B	31	2C	47	4C
16	1A	32	3B	48	3A

Para avaliar a influência dos agentes tensoativos utilizados na purga, umectante e emulsificante, sobre a atividade da enzima, foram realizados ensaios segundo os níveis

apresentados na Tabela 3.5 e o planejamento experimental proposto na Tabela 3.6. Os valores de concentração de agente emulsificante e umectante, nos níveis estudados no planejamento experimental, correspondem ao valor mínimo (-1) e máximo (+1) sugerido pelo fabricante.

Os níveis estudados para determinar as condições ótimas para a aplicação do caldo estabilizado na biopurga, usando substrato modelo (xilana *birchwood*), são apresentados na Tabela 3.7 (caso 1 e caso 2) e o planejamento experimental proposto para essas condições são apresentadas na Tabela 3.8. Essas condições foram definidas após os ensaios de biopurga preliminares, quando a enzima não estava estabilizada, e após a análise estatística dos ensaios de estabilidade do caldo bruto na presença de tensoativos.

Tabela 3.5. Níveis dos parâmetros estudados para avaliar a influência dos agentes tensoativos sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Fator	Concentração	-1	0	1
1	Tempo [min]	30,0	45,0	60,0
2	Agente emulsificante [g/L]	1,0	1,5	2,0
3	Agente umectante [g/L]	1,0	3,0	5,0

Tabela 3.6. Planejamento experimental 3^3 utilizado para avaliar a influência dos agentes tensoativos sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Ensaio	Fator			Ensaio	Fator		
	1	2	3		1	2	3
1	+1	-1	-1	15	+1	+1	-1
2	+1	-1	+1	16	+1	-1	-1
3	+1	+1	+1	17	-1	-1	-1
4	-1	-1	-1	18	-1	+1	+1
5	-1	-1	+1	19	-1	+1	+1
6	+1	+1	+1	20	-1	-1	+1
7	-1	+1	-1	21	+1	+1	-1
8	-1	+1	-1	22	-1	-1	-1
9	+1	+1	+1	23	-1	+1	-1
10	0	0	0	24	+1	-1	+1
11	-1	-1	+1	25	+1	-1	+1
12	-1	+1	+1	26	+1	-1	-1
13	0	0	0	27	+1	+1	-1
14	0	0	0	-	-	-	-

Tabela 3.7. Níveis dos parâmetros estudados na determinação das condições ótimas sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado para aplicação na biopurga – caso 1 e 2.

Fator	Nível	Caso 1			Caso 2		
		-1	0	1	-1	0	1
1	Tempo [minutos]	40,0	50,0	60,0	40,0	50,0	60,0
2	Sorbitol [M]	0,5	-	1,0	1,0	-	2,0
3	Tipo de agitação	Com	-	Sem	Com	-	Sem
4	Agente umectante [g/L]	3,0	-	5,0	3,0	-	5,0

Tabela 3.8. Planejamento no planejamento fatorial completo de 4 fatores, misto de 2 e 3 níveis, utilizado para determinar as condições ótimas sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado para aplicação na biopurga.

Ensaio	Fator				Ensaio	Fator			
	1	2	3	4		1	2	3	4
1	0	+1	+1	-1	25	-1	-1	-1	+1
2	-1	+1	-1	+1	26	+1	-1	+1	+1
3	+1	+1	+1	+1	27	+1	+1	+1	+1
4	-1	-1	+1	-1	28	-1	-1	-1	-1
5	0	+1	+1	+1	29	-1	-1	-1	+1
6	+1	+1	+1	-1	30	+1	+1	-1	-1
7	0	-1	+1	+1	31	0	-1	-1	+1
8	-1	-1	+1	-1	32	-1	-1	+1	+1
9	+1	-1	-1	-1	33	-1	+1	+1	+1
10	+1	-1	-1	+1	34	+1	-1	-1	-1
11	+1	+1	-1	+1	35	+1	-1	+1	-1
12	+1	-1	+1	+1	36	0	-1	+1	+1
13	-1	+1	-1	-1	37	+1	+1	-1	-1
14	+1	+1	+1	-1	38	-1	+1	+1	-1
15	0	+1	+1	-1	39	0	-1	-1	-1
16	0	+1	-1	+1	40	+1	-1	-1	+1
17	0	-1	+1	-1	41	0	-1	-1	+1
18	+1	+1	-1	+1	42	0	-1	-1	-1
19	-1	+1	-1	-1	43	0	-1	+1	-1
20	-1	-1	-1	-1	44	-1	+1	+1	+1
21	-1	+1	-1	+1	45	-1	-1	+1	+1
22	0	+1	-1	+1	46	0	+1	-1	-1
23	0	+1	-1	-1	47	-1	+1	+1	-1
24	+1	-1	+1	-1	48	0	+1	+1	+1

3.5. PROCESSOS UTILIZADOS

A partir dos resultados obtidos, na literatura, em experiências prévias e nos planejamentos experimentais, para melhor condição de estabilidade e atividade na presença dos agentes umectante e emulsificante, foi realizada a purga enzimática usando 75 U/g de substrato como concentração de enzima. A seguir são apresentados os processos de purga, alcalina e enzimática, utilizadas nos corpos de prova, malhas 100% algodão (CO). Os ensaios de purga (alcalina e enzimática) foram desenvolvidos no aparelho de laboratório para tingimento até 135°C ALT-B 9306, com microprocessador Datex Pico II, marca Mathis.

3.5.1. Purga Enzimática

Considerando a similaridade dos tratamentos enzimáticos, apesar da peculiaridade entre as fibras de algodão e linho, foram considerados os seguintes procedimentos para fibra de algodão, com base na observação de Ossola e Galante (2004), para a fibra de linho: preparação (pré-lavagem) dos tecidos para umedecer completamente o material e remover a hidrofobicidade. Para facilitar a interação, fibra/enzima antes do processo enzimático foi realizada uma etapa de preparação, conforme experimentos anteriormente realizados por Hartzel, 1998; Hsieh e Cram, 1999; Buschle-Diller, 2001b; Lenting *et al.*, 2002 e Ossola e Galante, 2004, a pré-mistura da solução tampão, umectante e enzima antes da introdução dentro do equipamento para ter uma distribuição homogênea e evitar a absorção irregular da enzima na fibra.

Os corpos de prova foram submetidos a dois tipos de ensaios: os preliminares, na qual o caldo bruto não estava estabilizado e os ensaios com o caldo bruto em condições de estabilidade. Os ensaios preliminares foram realizados segundo dois processos distintos: A) contendo etapa de umectação inicial seguida de lavagem antes da aplicação enzimática, B) *all in*, na qual todos os agentes químicos foram adicionados no mesmo banho que a enzima. O processo enzimático A, com umectação inicial, foi realizado com adição de umectante na etapa do banho enzimático. Os experimentos foram realizados com controle (tampão e agentes químicos), para avaliar o efeito da enzima. Os gráficos representativos dos processos A e B são mostrados nas Figuras 3.1 e 3.2, respectivamente. Após os ensaios realizados com o caldo bruto centrifugado para obter as condições ideais para estabilização, tempo e agentes tensoativos, foi empregada a biopurga com preparação.

As quantidades dos produtos utilizados, nos ensaios preliminares, nas etapas da biopurga para tecidos em malha 100% algodão, com relação de banho (RB) de 1:10, 100 U de atividade de xilanase/g de substrato, 7 esferas de aço inox, de 6 mm de diâmetro, para auxiliar a agitação mecânica a 40 rpm. Nas etapas do processo que continham a enzima foi utilizada solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, conforme procedimento apresentado na Tabela 3.9. Nas outras etapas do processo, foi utilizada água destilada. Os agentes químicos utilizados na purga enzimática foram: sequestrante: Sirrix® CV, umectante: Sandozin* SNP.BR e emulsificante: Fongralen* M, da marca Clariant.

A Figura 3.1 mostra o perfil do processo de biopurga com etapas de preparação e lavagem antes da purga enzimática, visando à influência da acessibilidade das enzimas ao substrato, bem como a remoção dos possíveis metais que poderiam interferir no tratamento enzimático. Na Figura 3.2 é apresentado o perfil do processo *all in*.

Nos ensaios preliminares, na etapa de preparação foi utilizado umectante e sequestrante, a 80°C durante 15 minutos, seguida por uma etapa de lavagem, somente com água, a 60°C durante 10 minutos. Antes da introdução do substrato aos canecos, 1 g/L de emulsificante e foi misturado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M a 100 U de enzima, para garantir a homogeneidade da enzima e consequentemente sua atuação uniforme nas fibras. Utilizou-se nos testes as temperaturas de 50°C e 60°C durante 30 minutos. A inativação da enzima foi realizada pela elevação da temperatura do banho para 90°C, durante 15 minutos. A seguir, foram realizadas duas lavagens, de 10 minutos: uma a 70°C e outra a temperatura ambiente. Antes e após o processo de biopurga os corpos de prova são submetidos à secagem em estufa de ar forçado a 105°C durante 4 horas, para determinação de perda de massa. Os valores dos parâmetros em cada uma das etapas do processo de biopurga apresentados na Figura 3.1 e Figura 3.2 estão definidos na Tabela 3.10.

Nos ensaios com o caldo bruto estabilizado, foram seguidas as mesmas regras com as seguintes exceções de condições: concentração de umectante (3 e 5 g/L), concentração de enzima (75 U/g substrato), presença de 1,0 M de sorbitol (estabilizante), no banho, temperatura de incubação 50°C, e tempo de incubação igual a 60 minutos.

A Figura 3.2 mostra o processo *all in* no qual os produtos químicos e enzima são todos adicionados no início do processo, ou seja, não existe etapa de umectação, pois o emulsificante, umectante e enzima são adicionados juntos. Neste perfil *all in*, foram mantidas as mesmas condições de tempo e temperatura para purga enzimática, inativação e lavagens subsequentes, citadas para o perfil apresentado na Figura 3.1. As amostras foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar a 105°C durante 4 horas.

Tabela 3.9. Procedimento (receita) utilizado na biopurga de tecidos em malha 100% algodão, pH 9,0, RB 1:10, 7 esferas de aço inox e agitação de 40 rpm.

Etapa	Purga enzimática com etapa de umectação	Etapa	Purga enzimática <i>all in</i>
1	Sequestrante (1 mL/L); Umectante (1,0 g/L); Água destilada; T = 80°C; t = 15 minutos.	1a	Umectante (2,0 g/L); Emulsificante (1,0 g/L); 100 U de xilanase/g de substrato; Solução tampão glicina-NaOH; T = 50°C ou 60°C; t = 30 minutos.
2	Lavação: T = 60°C; t = 10 minutos.		
3a	Emulsificante (1,0 g/L); Umectante (x g/L); x U de xilanase/g de substrato; Solução tampão glicina-NaOH; T = 50°C ou 60°C; t = x minutos.	1b	Desativação da enzima T = 90°C, t = 15 minutos.
3b	Desativação da enzima T = 90°C, t = 15 minutos.		
4	Lavação: T = 70°C; t = 10 minutos.	2	Lavação: T = 70°C; t = 10 minutos.
5	Lavação: T = 25°C; t = 10 minutos.	3	Lavação: T = 25°C; t = 10 minutos.

Sequestrante: Sirrix® CV; umectante: Sandozin* SNP.BR e emulsificante: Fongralen* M da Clariant. As indicações de quantidades indicadas com a incógnita “x” foram alteradas nos ensaios de biopurga para as condições da enzima antes e após estabilização.

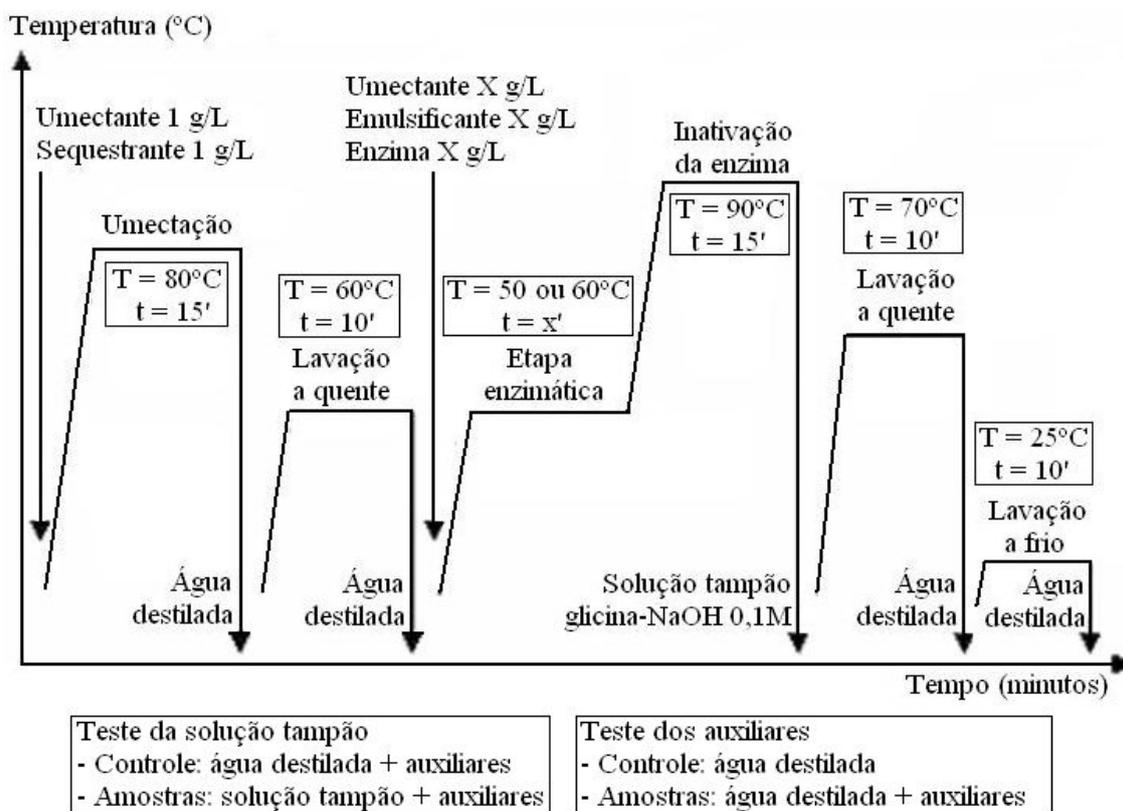


Figura 3.1. Processo de biopurga com umectação inicial, antes da etapa enzimática.

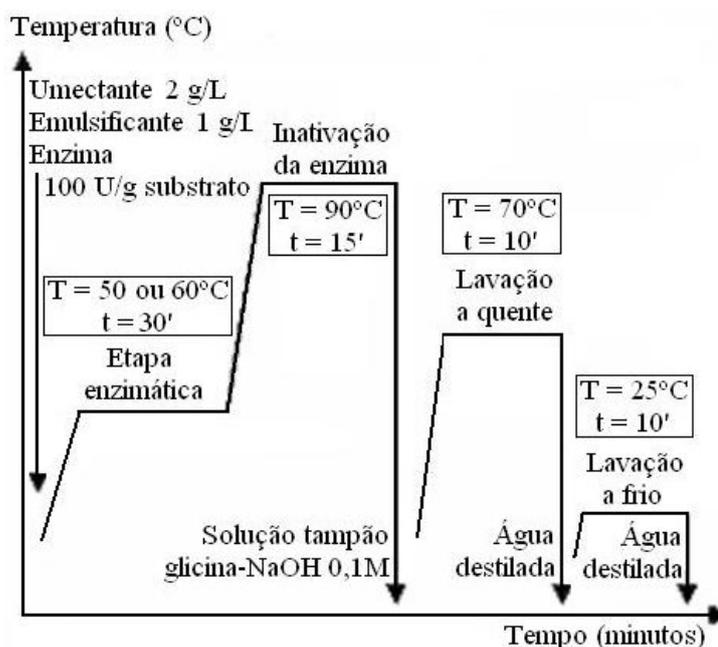


Figura 3.2. Processo de biopurga *all in*.

3.5.2. Purga Alcalina

A purga alcalina é utilizada convencionalmente para a remoção da matéria graxa e colorífica das fibras, por isso consta neste trabalho como padrão de resposta. O perfil do processo de purga alcalina, para tecidos em malha 100% algodão, com relação de banho (RB) de 1:10 está representado na Figura 3.3 e as condições utilizadas nos patamares são apresentados na Tabela 3.10.

Tabela 3.10. Procedimento (receita) utilizado para purga alcalina de tecidos em malha 100% algodão, RB=1:10.

Etapa	Produtos e quantidades
1	Sequestrante (1 mL/L); umectante (1,0 g/L); NaOH 50% (4 mL/L); água destilada; T = 90°C; t = 30 minutos.
2	Lavagem: T = 70°C; t = 10 minutos.
3	Lavagem: ácido acético (0,5 mL); T = 50°C; t = 10 minutos.
4	Lavagem: T = 25°C; t = 5 minutos.

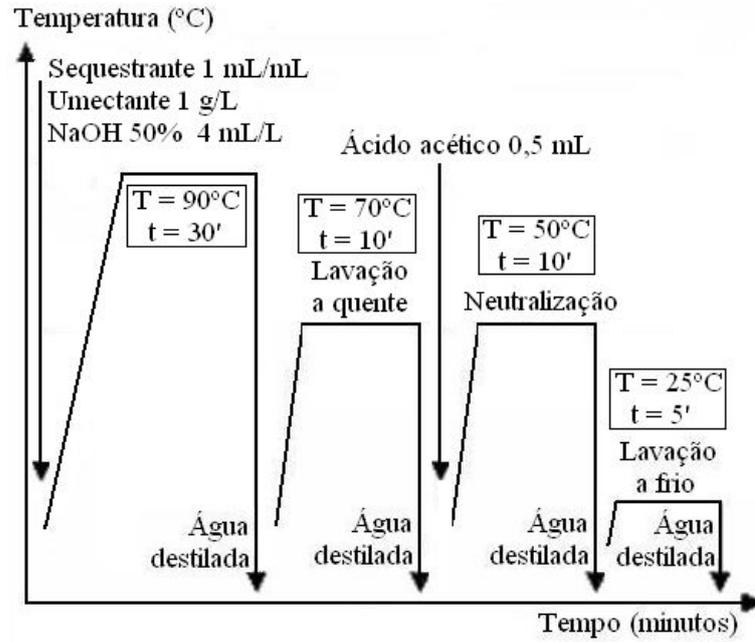


Figura 3.3. Perfil do processo de purga alcalina.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

As propriedades das xilanases presentes no caldo bruto centrifugado do *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 e na preparação enzimática Pulpzyme HC são mostradas na Tabela 4.1. As condições utilizadas para o caldo bruto também foram utilizadas para a Pulpzyme HC, uma vez que esta enzima comercial foi empregada como parâmetro de comparação para o desempenho do caldo bruto, após estabilização, na biopurga.

Tabela 4.1. Propriedades das xilanases presentes no caldo bruto centrifugado do *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 e na preparação enzimática Pulpzyme HC.

Propriedades	Caldo bruto	Pulpzyme HC
Proteína total (mg)	7,88±0,68	ND
Atividade total (U/mL)	188,65 ^a	460 ^d /120.000 ^e /1636,67 ^f
Atividade específica (U/mg)	23,94	ND
pH ótimo	9,0 ^b	7,0-8,0 ^c
Temperatura ótima (°C)	55°C ^a (60°C ^b)	60-70°C ^c

^adeterminado pela autora, 55°C, pH 9,0; ^btempo de incubação: 10 minutos (Duarte *et al.*, 2000); ^cBhardwaj *et al.*, 1996; ^d40°C e pH 6,0 – Ossola e Galante, 2004; ^e50°C e pH 7,0 – Csiszár *et al.*, 2001; ^f60°C e pH 9,0. ND = Não determinada devido a interferentes.

A massa molecular das enzimas determinada pela eletroforese desnaturante SDS-PAGE, é apresentada na Figura 4.1, onde o caldo bruto centrifugado do *Bacillus pumilus* CBMAI 0008, foi estimado em 12 kDa. Esse resultado é próximo do encontrado por Duarte *et al.*, (1999) na análise de proteínas extracelulares, 15,5 kDa, em gel homogêneo com 12% de poliacrilamida. Para a Pulpzyme HC, foram obtidas várias bandas, sendo uma banda com massa molecular idêntico ao do caldo bruto, 12,00 kDa. Para Ossola e Galante (2004), essa mesma preparação, em SDS-PAGE com gel de 11% de poliacrilamida, não mostrou tantas bandas como observadas nesse trabalho.

4.2. ATIVIDADE CELULOLÍTICA

As enzimas estudadas, apresentaram pequena atividade endoglucanase, em tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, a 50°C, após 30 minutos de incubação. Foi obtida 0,627 $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$ de atividade endoglucanase para o caldo bruto centrifugado e 0,472 $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$ para a preparação enzimática Pulpzyme HC.

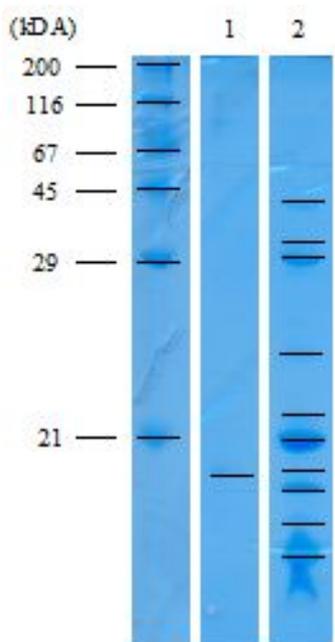


Figura 4.1. Eletroforese SDS-PAGE do (1) caldo bruto centrifugado de xilanase de *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 e (2) Pulpzyme HC revelado com corante comassie brilliant blue R-250. Padrão de peso molecular: a (200,0 kDa), β -galactosidase – *Escherichia coli* recombinante (116,0 kDa), albumina bovina (67,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa); carboanidrase (29,0 kDa); inibidor de tripsina (21,0 kDa).

4.3. ATIVIDADE XILANOLÍTICA EM FUNÇÃO DO pH E DA TEMPERATURA

Como toda reação, a enzima, sofre 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 a desnaturação da enzima. Toda enzima apresenta uma combinação de pH e temperatura cuja atividade enzimática é máxima. Entretanto, muitas vezes esta combinação não permite o uso em processos industriais, pois a enzima apresenta rápida desnaturação. (Voet e Voet, 2006). Por isso, foi realizado neste trabalho um estudo da condição de pH ótimo de processo (9,0), na temperatura 50°C, visando à futura aplicação industrial do processo, uma vez que o caldo bruto centrifugado de xilanase, nestes ensaios, não continham estabilizante enquanto, a preparação enzimática Pulpzyme HC possui estabilizante.

Os dados obtidos nos experimentos quanto à atividade enzimática da enzima xilanase (caldo bruto) e Pulpzyme HC (preparação enzimática), em função do pH, são apresentados na Figura 4.2 e na Figura 4.3, respectivamente.

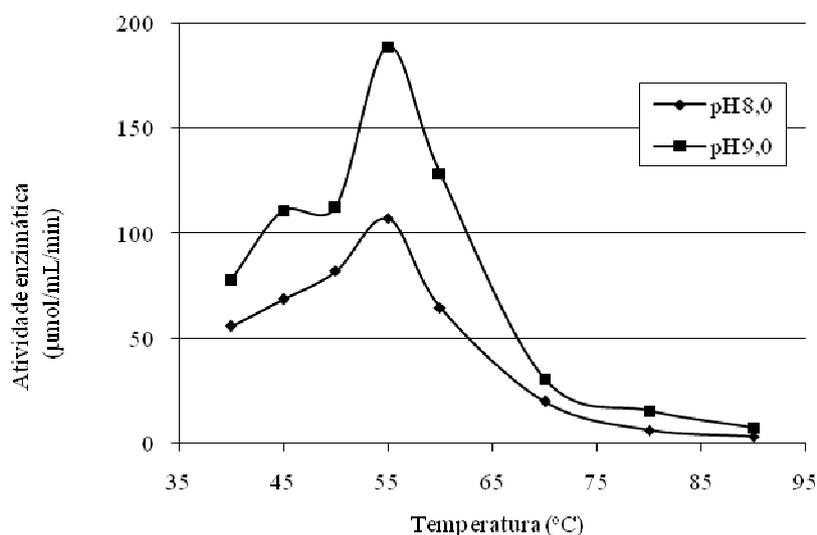


Figura 4.2. Atividade enzimática xilanolítica em função da temperatura do caldo bruto centrifugado, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 8,0, e glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

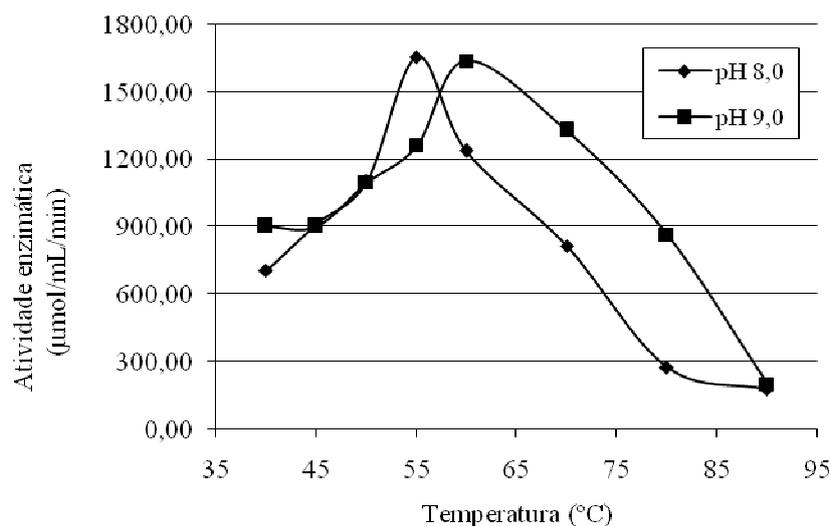


Figura 4.3. Atividade enzimática xilanolítica em função da temperatura da preparação enzimática Pulpzyme HC em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 8,0, e glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

A Figura 4.2 mostra o efeito da temperatura na atividade enzimática em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 8,0, e glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. Em trabalho anterior de Duarte *et al.* (2000) obteve a atividade máxima, após 10 minutos de incubação, a 60°C, entretanto conforme pode ser observado na Figura 4.2 a temperatura de atividade máxima ocorre a 55°C, após 5 minutos de incubação. Se for considerada a atividade enzimática por minuto, nota-se que a diferença entre as atividades a 55°C e 60°C é de 3 U/mL, o que poderia ser considerada praticamente a mesma. Portanto, para aplicação industrial, torna-se interessante obter atividade máxima a temperatura mais baixa porque além da enzima manter-se estável, o uso de uma temperatura inferior também garante um menor consumo de energia no processo. Entretanto, para a preparação enzimática Pulpzyme HC, observa-se na Figura 4.3 que a atividade máxima, para o pH 8,0 ocorre a 55°C e para o pH 9,0, a 60°C.

4.4. ESTABILIDADE TÉRMICA

Para avaliar a estabilidade térmica das enzimas foi determinado o tempo de meia-vida e a constante de desativação, através da atividade enzimática sobre o substrato xilana dissolvido em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, em xilana de bétula, para xilanase e para Pulpzyme HC, por este ser o pH de atividade máxima.

Os resultados experimentais obtidos no teste de estabilidade térmica para o caldo bruto centrifugado, em solução tampão glicina-NaOH 0,1M, pH 9,0, para o intervalo de temperatura 40-90°C, são apresentados na Tabela 4.2 e esses dados graficados, são mostrados na Figura 4.4. Observa-se que o caldo bruto centrifugado apresentou comportamento estável, a 40°C, após 150 minutos de incubação. A 50°C, em 60 minutos de incubação a atividade remanescente foi da ordem de 31,17% e após 150 minutos a atividade diminui para 7,4%. Verifica-se que acima de 60°C, ocorre rápida desnaturação, indicando que o processo de inativação por temperatura pode ser utilizado entre 60-90°C, durante 15 minutos. Com base nestes resultados comprova-se a necessidade de adição de osmólitos para manter a estabilidade da enzima durante o processo de aplicação industrial, cujos resultados serão apresentados nesta mesma seção.

Para a preparação enzimática Pulpzyme HC, em solução tampão glicina-NaOH 0,1M, pH 9,0, a Tabela 4.3 apresenta a atividade remanescente em função do tempo de incubação no intervalo de temperatura de 40-90°C e a Figura 4.5, a Tabela 4.3 na forma

gráfica. Observa-se que a Pulpzyme HC após 150 minutos de incubação, a 40°C, permaneceu com 100% da atividade inicial. Acima desta temperatura a enzima apresenta comportamento térmico instável.

Tabela 4.2. Atividade xilanolítica remanescente (%) em função do tempo de incubação, para o caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Tempo (minutos)	Atividade remanescente (%)					
	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
1	ND	ND	ND	ND	ND	5,07
3	ND	ND	ND	ND	2,50	2,15
5	ND	ND	ND	1,42	1,58	1,32
10	ND	ND	ND	1,01	1,04	1,15
15	100,00	81,25	5,16	0,95	0,96	1,04
20	ND	ND	ND	0,92	0,93	1,11
30	100,00	62,82	3,32	0,88	0,96	1,04
45	100,00	49,30	3,39	0,88	ND	ND
60	98,63	37,93	3,32	0,88	ND	ND
90	98,05	21,17	3,15	ND	ND	ND
120	90,68	15,65	3,22	ND	ND	ND
150	86,82	12,71	3,11	ND	ND	ND

ND = Atividade remanescente não determinada, nesse tempo, para essa temperatura.

A 50°C verifica-se que a atividade remanescente após 150 minutos foi aproximadamente 90%. A Pulpzyme apresenta 50% de atividade residual após 150 minutos, na temperatura de máxima atividade (60°C). Verifica-se que a 70°C esta enzima ainda apresenta atividade nos primeiros 15 minutos. Para as temperaturas de 80°C e 90°C, a enzima foi desativada em 15 minutos. Em função desta enzima ser uma preparação enzimática e possuir estabilizante na sua composição e estar sendo utilizada somente como parâmetro para a xilanase, não foram realizados testes para as temperaturas superiores a 70°C, em tempos inferiores a 15 minutos.

Conforme verificado, tanto a xilanase quanto a Pulpzyme HC sofrem a desnaturação na temperatura de máxima atividade. Outra justificativa para a Pulpzyme HC ter mantido 50% da atividade inicial após 150 minutos, enquanto para xilanase somente 3%, na temperatura de máxima atividade, se deve a presença de estabilizante na preparação enzimática da Pulpzyme

HC. Assim, para empregar o caldo bruto da xilanase em uma temperatura maior, por um período de tempo maior, tendo garantia da estabilidade térmica, será necessário a adição de estabilizantes, como polióis, ao caldo.

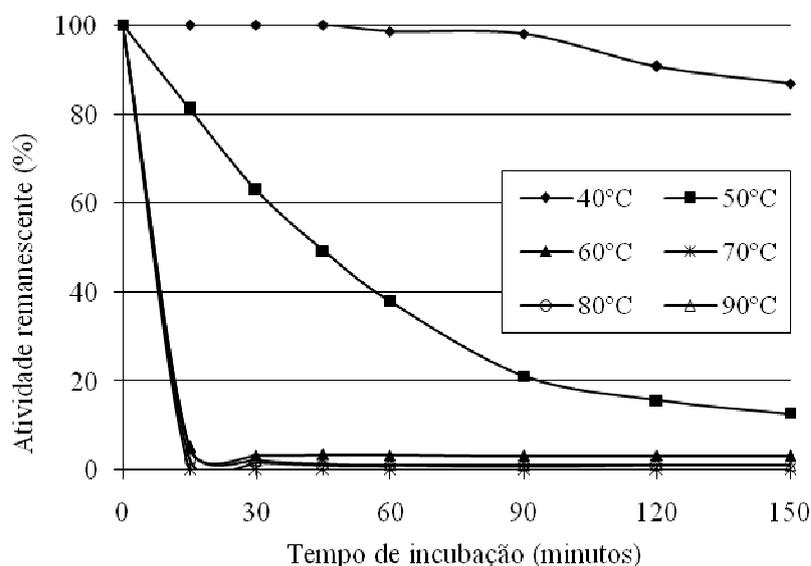


Figura 4.4. Atividade xilanolítica remanescente (%) para o caldo bruto centrifugado, durante 150 minutos no intervalo de temperatura de 40-90°C, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Tabela 4.3. Atividade xilanolítica remanescente (%) em função do tempo de incubação, para a preparação enzimática Pulpzyme HC em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Tempo (minutos)	Atividade remanescente (%)					
	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
15	89,88	90,50	81,03	35,51	1,71	1,71
30	92,38	87,71	70,93	22,81	2,04	1,71
45	93,84	89,01	64,95	18,01	1,82	1,71
60	97,80	87,52	62,27	10,29	1,82	1,71
90	102,49	86,78	57,11	7,55	1,82	1,71
120	104,11	84,92	54,85	7,38	1,71	1,71
150	98,39	86,41	51,13	6,18	1,82	1,71

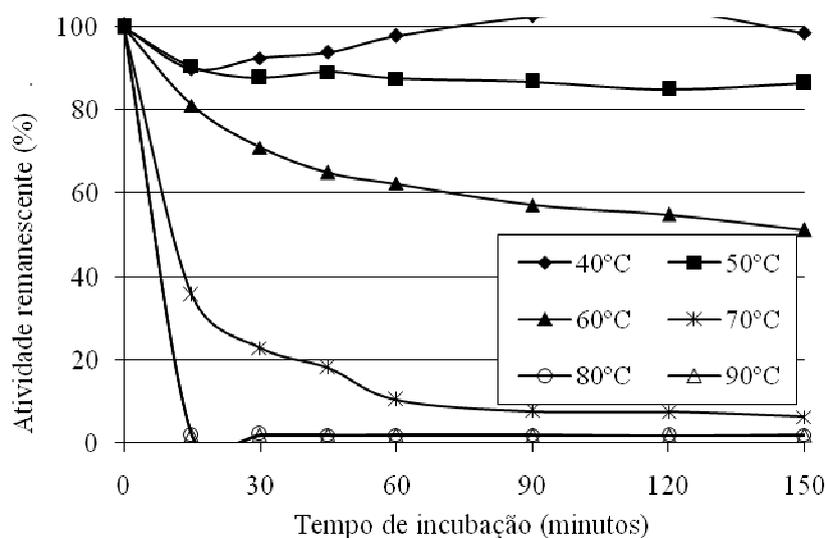


Figura 4.5. Atividade xilanolítica remanescente (%) para a preparação enzimática Pulpzyme HC, durante 150 minutos no intervalo de temperatura de 40-90°C, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

A partir destes resultados tem-se que a temperatura ideal para o processo de biopurga com o substrato têxtil, utilizando Pulpzyme HC, está no intervalo de 40-60°C, com tempo de incubação não excedente a 60 minutos. Para o processo de inativação a temperatura deve ser superior a 80°C, durante 15 minutos.

Vários trabalhos sobre termoestabilidade de xilanase são apresentados na literatura, desde a faixa ácida à alcalina. Dentre todos esses trabalhos nota-se que o pH alcalino apresenta a menor atividade remanescente, conforme já apresentado em literatura (Xiong *et al.*, 2004). Essa influência negativa do pH alcalino sobre a rápida desativação da enzima pode ocorrer em função da desprotonação dos grupos carboxílicos da proteína e o complexo adquire carga negativa, ou seja, predominância da espécie aniônica, que afeta a estrutura da enzima ou das ligações no sítio ativo, influenciando a estabilidade da enzima (COSTA *et al.*, 2002).

A estabilidade térmica da xilanase de *B. coagulans* BL53 a 50-80°C, em tampão acetato 100 mM pH 5,0, acima de 50°C, reduz drasticamente com o passar do tempo (Heck *et al.*, 2006). Foi verificado que a xilanase purificada de *Trichoderma reesei* QM 9414, em pH 5,0, permaneceu estável depois da pré-incubação a 50°C, na ausência de substrato, durante 30 minutos. Entretanto quando a temperatura foi aumentada para 55°C, a atividade foi reduzida

50%. Em testes de pré-incubação, à temperatura ambiente, num intervalo de pH 5,0-8,5, após 22 horas, permaneceu com 80% de atividade residual (COBOS e ESTRADA, 2003).

A xilanase de *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145, em tampão universal 0,12M, pH 6,0, apresentou boa estabilidade térmica, pois a 60°C a enzima manteve 50% da atividade inicial depois de 4 horas de incubação e 20% de atividade após 1 hora a 70°C (SINGH *et al.*, 2000).

Quando a xilanase de *Thermomonospora* sp. foi exposta durante 6 horas a 70°C, em pH 6,5 (tampão citrato 50 mM) e 7,0 (tampão Tris-HCl 50 mM) a enzima manteve aproximadamente 48% de atividade remanescente. Quando submetida em pH 7,0, a 60°C, o tempo de meia-vida foi 8 horas; a 70°C (temperatura ótima) foi 4 horas e a 80°C somente 9 minutos (George *et al.*, 2001). Quando o pH foi modificado para 8,0 e 9,0 (tampão Tris-HCl 50 mM) manteve 39% e 31% de atividade remanescente e em pH 12,00 (tampão glicina-NaOH 50 mM) ocorreu rápida inativação.

4.4.1. Energia de Ativação da Reação Enzimática

A aplicação das equações 3.4a às atividades enzimáticas em função da temperatura conforme descrito no item 3.3.2, para a xilanase, e para a Pulpzyme HC, possibilitou obter-se os valores da energia de ativação da reação enzimática. Os valores obtidos para a energia de ativação da reação enzimática e constante de Arrhenius, para o caldo bruto centrifugado, para o pH 8,0 e 9,0, são apresentados na Tabela 4.4. Observa-se que a energia de ativação da reação enzimática com xilanase no pH 8,0 é 7,23 kcal/mol e que este valor é menor do que o encontrado para o pH 9,0, 10,25 kcal/mol. Os parâmetros da equação de Arrhenius e energia de ativação obtidos para a preparação enzimática Pulpzyme HC são apresentados na Tabela 4.5. Verifica-se que a preparação enzimática Pulpzyme HC apresentou a mesma tendência de comportamento que o apresentado pelo caldo bruto centrifugado. Observa-se que a energia de ativação no pH 8,0 foi 6,49 kcal/mol e que este valor é menor do que o encontrado para o pH 9,0 que foi 7,01 kcal/mol.

No pH ótimo (9,0), para a xilanase de *B. pumilus* CBMAI 0008, a energia de ativação de Arrhenius para a reação enzimática (E_a), para o intervalo de temperatura de 40-55°C, foi 46,49 kJ/mol. Se o valor da energia de ativação calculado pela equação de Arrhenius linearizada, é bastante pequeno, como determinado para a xilanase de *B. pumilus* CBMAI 0008, sabe-se que não é uma barreira de energia alta para catálise e, portanto, um pequeno

aumento na temperatura aumentaria exponencialmente o número de moléculas de enzima ativada, com a mesma energia ou acima da energia de ativação, capaz de reagir. (Cobos e Estrada, 2003). Este valor de E_a foi maior que o reportado pela literatura para xilanases produzidas por fungos e outras bactérias. O *Trichoderma reesei* QM 9414 (Cobos e Estrada, 2003) em pH 5,0, foi encontrado $E_a = 32,1$ kJ/mol, para *Thermomyces lanuginosus* linhagem DSM 10635 (Xiong *et al.*, 2004), no pH ótimo (6,5), nas temperaturas entre 50-70°C, foi $E_a = 34$ kJ/mol.

Tabela 4.4. Parâmetros da equação de Arrhenius para o caldo bruto centrifugado em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 8,0, e glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

pH	$Ae = k \exp(-E_a/RT)$	k [U/mL]	E_a [kcal/mol]
8,0	$Ae = 1,536115 \cdot 10^6 \exp(-7.232,13/RT)$	$1,5361 \cdot 10^6$	7,23
9,0	$Ae = 2,474920 \cdot 10^8 \exp(-10.251,15/RT)$	$2,4749 \cdot 10^8$	10,25

* Ae = Atividade Enzimática [$\mu\text{mol/mL}$]; k = Constante de Arrhenius [$\mu\text{mol/mL}$]; E_a = Energia de ativação [kcal/mol].

Tabela 4.5. Parâmetros da equação de Arrhenius para a preparação enzimática Pulpzyme HC em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 8,0, e glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

pH	$Ae = k \exp(-E_a/RT)$	k [U/mL]	E_a [kcal/mol]
8,0	$Ae = 6,618923 \cdot 10^5 \exp(-6.491,26/RT)$	$6,6189 \cdot 10^5$	6,49
9,0	$Ae = 1,773033 \cdot 10^4 \exp(-7.006,08/RT)$	$1,7730 \cdot 10^4$	7,01

* Ae = Atividade enzimática [$\mu\text{mol/mL}$]; k = Constante de Arrhenius [$\mu\text{mol/mL}$]; E_a = Energia de ativação [kcal/mol].

Uma pequena variação de temperatura na solução de uma proteína pode alterar abruptamente as propriedades suas conformacionais como rotação óptica, viscosidade e absorção de ultravioleta (UV). Assim o desdobramento de qualquer parte da estrutura desestabiliza a estrutura restante que colapsa simultaneamente para uma estrutura aleatória (VOET e VOET, 2006).

Assim, para avaliar a estabilidade térmica das enzimas foi determinado o tempo de meia-vida e a constante de desativação, na solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, para xilanase e para Pulpzyme HC, por este ser o pH de atividade máxima. Os resultados experimentais obtidos no teste de estabilidade térmica para o caldo bruto centrifugado de xilanase são apresentados na Tabela 4.3 e Figura 4.5. Observa-se que o caldo bruto da xilanase, a 40°C, permanece com aproximadamente 87% da atividade inicial após 150 minutos de incubação. Entretanto para 50°C verifica-se uma atividade remanescente da ordem de 13%, após 150 minutos. Verifica-se que na temperatura de máxima atividade da enzima,

60°C, ocorre rápida desnaturação. A atividade residual nesta temperatura foi aproximadamente 5% e 3%, após 15 e 150 minutos de incubação, respectivamente. Nas temperaturas 70°C e 80°C verifica-se a rápida e completa desnaturação depois de 10 minutos de incubação, pois após este tempo a atividade residual verificada não apresenta diferença. A 90°C esta desnaturação é verificada após 5 minutos.

4.4.2. Constante de Desativação Enzimática

Visando avaliar o tempo na qual a enzima permanecerá ativa no processo, determinou-se conforme descrito no item 3.3.2, a constante de desativação enzimática e o tempo de meia-vida. Na Tabela 4.6 é apresentada a constante de desativação e tempo de meia-vida do caldo bruto, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0 para o intervalo de temperatura de 40-90°C. Observa-se na Tabela 4.6 que à medida que ocorre o aumento da temperatura a constante de desativação aumenta, enquanto o tempo de meia-vida diminui. Na temperatura mais branda (40°C) verifica-se tempo de meia-vida equivalente a 9,2 horas. Resultados mais promissores foram obtidos para a xilanase de *Thermomonospora* sp. (temperatura ótima 70°C e pH 7,0) cujo tempo de meia-vida a 60°C foi 8 horas; 70°C, 4 horas e a 80°C somente 9 minutos (GEORGE *et al.*, 2001).

A partir dos dados de desnaturação térmica para o intervalo 60-90°C foi possível determinar o fator exponencial (k_d^0) e a energia de desnaturação térmica da enzima (E_d). Para isso utilizou-se a equação obtida no gráfico tipo Arrhenius ($\ln k_d = -10,050093/T + 32,040533$ e $R^2 = 0,882790$), que pode ser representada pela equação (4.1).

$$k_d = 8,222932 \cdot 10^{13} \exp(-19969,54/RT) \quad (4.1)$$

Na Tabela 4.7 é apresentada a constante de desativação e tempo de meia-vida da preparação enzimática Pulpzyme HC, em solução tampão glicina-NaOH 0,1M, pH 9,0, para o intervalo de temperatura de 40-90°C. Os dados apresentados na tabela foram utilizados no mesmo intervalo de temperatura 60-90°C para determinar o fator exponencial (k_d^0) e a energia de desnaturação térmica da enzima (E_d). Para isso utilizou-se a equação obtida no gráfico tipo Arrhenius ($\ln k_d = -14,685186/T + 43,680271$ e $R^2 = 0,909176$), que pode ser representada pela equação (4.2).

$$k_d = 9,334706.10^{18} \exp(29179,47/RT) \quad (4.2)$$

Tabela 4.6. Constante de desativação térmica e tempo de meia-vida do caldo bruto centrifugado, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

T (°C)	Equação de ajuste	R ²	k _d (h ⁻¹)	t _{1/2} (min)
40	y = - 0,001257 x + 0,042649	0,821781	0,075420	551
50	y = - 0,018146 x - 0,018060	0,992864	1,088760	38
60	y = - 0,131536 x - 0,401130	0,889680	7,892160	5
70	y = - 0,155430 x - 0,682625	0,795432	9,325800	4
80	y = - 0,873851 x - 0,305132	0,916217	52,431060	< 1
90	y = - 1,187550 x - 0,746172	0,771547	71,253000	< 1

* y = ln(A_f/A_o); x = t.

Tabela 4.7. Constante de desativação térmica e tempo de meia-vida da preparação enzimática Pulpzyme HC, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

T (°C)	Equação de ajuste	R ²	k _d (h ⁻¹)	t _{1/2} (min)
40	ND	ND	ND	Estável
50	y = - 0,004362.x - 0,011137	0,920015	0,261720	158
60	y = - 0,009505.x - 0,032510	0,963792	0,570300	72
70	y = - 0,034957.x - 0,254245	0,938588	2,097420	19
80	y = -0,271340x - 0,000000	1,000000	16,280400	2
90	y = -0,269254x	1,000000	16,155240	2

* y = ln(A_f/A_o); x = t; ND = Não determinada devido a condição de estabilidade a essa temperatura.

Em trabalhos similares estudando xilanases de *Aspergillus* sp. 5 (linhagem 5) and *Aspergillus* sp. 44 (linhagem 44), em tampão acetato de sódio, pH 5,5, Gawande e Kamat (1998) obtiveram os resultados para *Aspergillus* sp. 5 a 50° C t_{1/2} = 240 min e k_d = 0,17 h⁻¹, a 60° C t_{1/2} = 15 min e k_d = 2,77 h⁻¹ e *Aspergillus* sp. 44 a 50° C t_{1/2} = 260 min e k_d = 0,16 h⁻¹, a 60° C t_{1/2} = 10 min e k_d = 4,1 h⁻¹. E a equação do gráfico de Arrhenius para *Aspergillus* sp. 5 free: y = - 9,5943x + 29,065, R² = 0,8986 e *Aspergillus* sp. 44 free: y = - 10,887x + 33,082, R² = 0,8846, onde y = log k e x = (1/T)*10⁻¹.

Entende-se por termoestabilidade a capacidade da enzima não sofrer desnaturação quando submetida à condições severas de temperatura na ausência de substratos. Entretanto, em muitos casos esse estudo pode induzir a erros quando se objetiva aplicação industrial, pois a ausência de substrato, dependendo do pH e temperaturas estudadas podem levar a aumento

ou diminuição do tempo de meia-vida, como no caso da xilanase de *Thermomyces lanuginosus* DSM 10635, quando incubada na faixa ácida 4,0-6,5 a 65-70°C, na presença de 1% de xilana birchwood apresenta maior tempo de meia-vida que na ausência de substrato, porém quando o pH é alcalino (pH 9,0), a 70°, o tempo de meia-vida na ausência de substrato é maior (19 minutos) que na presença de substrato (12 minutos) (XIONG *et al.*, 2004).

A atividade da enzima sofre decremento ou desativação à medida que a temperatura sofre incremento, para a enzima a energia de decaimento da atividade enzimática (E_{ad}) foi 91,58 kJ/mol, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, e intervalo de temperatura de 60-90°C. O valor da energia de desnaturação térmica obtido para a xilanase ($E_{ad} = 19.969,54$ cal/mol) em relação ao obtido para Pulpzyme HC ($E_{ad} = 29.179,47$ cal/mol), comprova a maior estabilidade da Pulpzyme HC em relação à xilanase. Na literatura foram encontrados valores para faixas de pH ácido para E_{ad} de xilanases, como 311 kJ/mol para xilanase de *Trichoderma reesei* QM 9414 em pH 5,0, no intervalo de temperatura 55-70°C (Cobos e Estrada, 2003); para a xilanase pura de *T. lanuginosus* DSM 10635, em pH 6,5, a E_{ad} foi 86 kJ/mol no intervalo de 70-90°C e o *T. lanuginosus* SSBP (Singh *et al.*, 2000), apresentou no intervalo de 60-90°C, no pH 5,0, $E_{ad} = 83,52$ kJ/mol, no pH 6,5, $E_{ad} = 102,33$ kJ/mol e no pH 9,0, $E_{ad} = 49,20$ kJ/mol, demonstrando que se a enzima estiver presente em um meio com valor de pH afastado do valor do pH ótimo, a E_{ad} sofrerá uma diminuição significativa no seu valor.

4.5. EFEITO DO TAMPÃO E DOS ESTABILIZANTES

O efeito dos tipos de solução tampão e estabilizantes sobre a atividade do caldo bruto centrifugado, conforme proposto no planejamento experimental, é apresentado na Tabela 4.8 e a estatística descritiva desses dados, na Tabela 4.9. Percebe-se na Tabela 4.9 que na análise dos efeitos de forma individual apresenta valores de desvio padrão elevados, que acabam influenciando no intervalo de confiança e confundindo as atividades. Por exemplo, para o efeito tipo de solução tampão, todos apresentaram elevados valores de desvio padrão, enquanto para o efeito tipo de estabilizante, o sorbitol e a ausência, apresentaram desvio padrão elevados. Quando se realiza a análise com o efeito do tipo de estabilizante e solução tampão combinados, percebe-se que ocorre uma diminuição no desvio padrão e os intervalos de confiança não se confundem.

Tabela 4.8. Resposta obtida no planejamento fatorial 2^4 , com duas replicatas, para a determinação da melhor combinação tipo de solução tampão/estabilizante sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado.

Ensaio	Parâmetros		AR (%)	Ensaio	Parâmetros		AR (%)
	Tampão	Estabilizante			Tampão	Estabilizante	
1	GNaOH	Xilitol	71,09	25	CB	Ausente	40,10
2	NaOH	Sorbitol	52,14	26	NaOH	Ausente	68,34
3	NaOH	Sorbitol	44,77	27	GNaOH	Xilitol	77,90
4	CB	Xilitol	89,84	28	GNaOH	Ausente	42,84
5	Água	Xilitol	69,13	29	NaOH	Xilitol	80,11
6	Água	Glicerol	90,92	30	GNaOH	Sorbitol	93,40
7	CB	Glicerol	65,68	31	CB	Xilitol	78,54
8	CB	Sorbitol	76,67	32	GNaOH	Sorbitol	93,60
9	GNaOH	Xilitol	77,55	33	CB	Glicerol	63,98
10	GNaOH	Sorbitol	96,05	34	Água	Ausente	67,36
11	CB	Ausente	38,35	35	NaOH	Ausente	70,73
12	GNaOH	Glicerol	74,26	36	NaOH	Glicerol	64,83
13	CB	Glicerol	59,74	37	NaOH	Sorbitol	45,64
14	NaOH	Glicerol	63,14	38	NaOH	Glicerol	60,37
15	CB	Sorbitol	85,95	39	GNaOH	Ausente	45,94
16	Água	Glicerol	98,74	40	Água	Xilitol	61,85
17	Água	Sorbitol	94,83	41	Água	Sorbitol	74,38
18	CB	Sorbitol	79,84	42	CB	Xilitol	80,95
19	Água	Xilitol	68,36	43	Água	Ausente	69,68
20	NaOH	Ausente	69,97	44	Água	Ausente	66,47
21	NaOH	Xilitol	74,07	45	CB	Ausente	33,79
22	Água	Glicerol	96,62	46	GNaOH	Ausente	42,30
23	GNaOH	Glicerol	72,25	47	NaOH	Xilitol	77,94
24	Água	Sorbitol	70,51	48	GNaOH	Glicerol	71,04

* CB = Solução Tampão Carbonato-Bicarbonato 0,1 M, pH 9,0; GNaOH = Solução Tampão Glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0; água pH 6,0; NaOH pH 9,0; AR = Atividade Remanescente. Atividade enzimática média inicial (50°C, 1 h, sem estabilizantes): Água Destilada (pH \approx 6,00) 44,99 U; Carbonato-Bicarbonato de Sódio 17,66 U; Glicina-NaOH 184,58 U; NaOH 112,97 U. A atividade enzimática média inicial com estabilizantes foi similar a sem estabilizantes.

A Tabela 4.10 apresenta a ANOVA da atividade remanescente em função do tipo de tampão e estabilizante. Adotou-se um nível de significância de 5% e as seguintes hipóteses nulas: H_0 : efeito da variável tampão sobre a resposta é nula; H_0 : efeito da resposta estabilizante sobre a resposta é nula; H_0 : o efeito combinado das variáveis tampão-estabilizante é nulo. Nota-se que o valor p em todas as hipóteses foi menor que o nível de significância adotado, então, rejeita-se as 3 hipóteses nulas. Portanto, tanto o tipo de tampão quanto de estabilizante e a combinação destes, afeta estatisticamente a atividade remanescente.

Tabela 4.9. Estatística descritiva da melhor combinação entre tipo de solução tampão e tipo de estabilizantes sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado.

Efeito	Nível do Fator	Nível do Fator	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	IC -95,00%	IC +95,00%
Total			48	67,48021	15,00250	2,65424	63,12394	71,83648
T	GNaOH	-	12	71,50417	18,97138	5,476566	59,45033	83,55801
T	NaOH	-	12	64,31583	11,66944	3,368676	56,90143	71,73024
T	CB	-	12	66,07167	19,19909	5,542301	53,87314	78,27019
T	Água	-	12	68,02917	8,11843	2,343587	62,87097	73,18737
E	Xilitol	-	12	75,57083	6,74021	1,945731	71,28831	79,85336
E	Sorbitol	-	12	75,44667	18,05616	5,212363	63,97433	86,91900
E	Glicerol	-	12	64,24750	5,70668	1,647376	60,62165	67,87335
E	Ausente	-	12	54,65583	15,04006	4,341691	45,09984	64,21183
TE	GNaOH	Xilitol	3	75,45667	1,67584	0,967546	71,29365	79,61968
TE	GNaOH	Sorbitol	3	94,35000	1,47564	0,851959	90,68432	98,01568
TE	GNaOH	Glicerol	3	72,51667	1,62648	0,939048	68,47627	76,55706
TE	GNaOH	Ausente	3	43,69333	1,96431	1,134098	38,81370	48,57296
TE	NaOH	Xilitol	3	77,37333	3,05961	1,766469	69,77283	84,97383
TE	NaOH	Sorbitol	3	47,43000	1,70297	0,983209	43,19959	51,66041
TE	NaOH	Glicerol	3	62,78000	2,25169	1,300013	57,18650	68,37350
TE	NaOH	Ausente	3	69,68000	1,22111	0,705006	66,64660	72,71340
TE	CB	Xilitol	3	83,00667	2,99937	1,731688	75,55581	90,45752
TE	CB	Sorbitol	3	80,73333	0,90716	0,523747	78,47983	82,98684
TE	CB	Glicerol	3	63,13333	3,05917	1,766214	55,53393	70,73274
TE	CB	Ausente	3	37,41333	3,25761	1,880783	29,32098	45,50569
TE	Água	Xilitol	3	66,44667	3,99940	2,309057	56,51160	76,38174
TE	Água	Sorbitol	3	79,27333	3,15324	1,820525	71,44025	87,10642
TE	Água	Glicerol	3	58,56000	2,42019	1,397295	52,54792	64,57208
TE	Água	Ausente	3	67,83667	1,65724	0,956806	63,71986	71,95347

* T = Tampão; E = Estabilizante; TE = Tampão*Estabilizante; CB = Solução Tampão Carbonato-Bicarbonato 0,1 M, pH 9,0; GNaOH = Solução Tampão Glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0; Água pH 6,0; NaOH pH 9,0; AR = Atividade Remanescente; IC = Intervalo de Confiança.

Tabela 4.10. ANOVA da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em função da combinação entre tipo de solução tampão e estabilizantes.

Causa da variação	GL	SQ	QM	F	p
Coeficiente	1	218571,80	218571,80	36.950,53	0,00E-01
Tampão	3	341,90	114,00	19,27	2,55E-07
Estabilizante	3	3646,10	1215,40	205,46	0,00E-01
Tampão*Estabilizante	9	6401,30	711,30	120,24	0,00E-01
Erro/Resíduos	32	189,30	5,90		
Total	47	10578,50			

*GL = Graus de Liberdade, SQ = Soma dos Quadrados, QM = Quadrado Médio.

Comparando-se o valor de F com o valor de F para o nível de significância de 5% segundo o número de graus de liberdade do numerador e do denominador, observa-se que $F = 1,992$. Como $F > F_{(3;32;0,05)}$, ou seja, todos os valores de F são maiores que 19,266, rejeita-se H_0 ao nível de 5% de significância. Logo, conclui-se do teste F que os fatores tampão, estabilizante e suas combinações, a um nível de significância de 5%, são estatisticamente diferentes.

Como o teste F não indica quais tratamentos são iguais, nem se são distintos, utilizou-se o teste de comparações múltiplas – teste de Tukey, apresentado na Tabela 4.11 e dos grupos homogêneos na Tabela 4.12. O teste de Tukey realizado sobre o tipo de tampão, mostra dois grupos homogêneos (NaOH com carbonato-bicarbonato e carbonato-bicarbonato com água) e um grupo (glicina-NaOH) que não se confunde com nenhum dos outros tipos de tampão estudados. Logo, pode-se afirmar, a um nível de significância de 5%, que a solução tampão glicina-NaOH apresenta valores únicos e os maiores valores de atividade remanescente, dada a sua média elevada e por possuir um intervalo de confiança dessa média que não se confunde com nenhum outro. Os resultados do tampão NaOH se confundem.

Tabela 4.11. Teste de Tukey aplicado às médias do tipo de tampão utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado.

Solução tampão	{1} 71,504	{2} 64,316	{3} 66,072	{4} 68,029
GNaOH	-	0,000165	0,000187	0,007349
NaOH	0,000165	-	0,306862	0,003948
CB	0,000187	0,306862	-	0,219936
Água	0,007349	0,003948	0,219936	-

*MQ = 5,9153, GL = 32,000; CB = Carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,0; GNaOH = Glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0; Água pH 6,0; NaOH pH 9,0.

Tabela 4.12. Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos do tipo de tampão utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado.

Solução tampão	Atividade remanescente (%)	1	2	3
NaOH	64,32	****		
CB	66,07	****	****	
Água	68,03		****	
GNaOH	71,50			****

*MQ = 5,9153, GL = 32,000. CB = Carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,0; GNaOH = Glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0; Água pH 6,0; NaOH pH 9,0.

Na Figura 4.6 observa-se o efeito do fator tipo de tampão sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado. As barras equivalem a 95% do intervalo de confiança e o ponto central a média. Nota-se que o tampão glicina-NaOH apresenta os maiores valores de atividade.

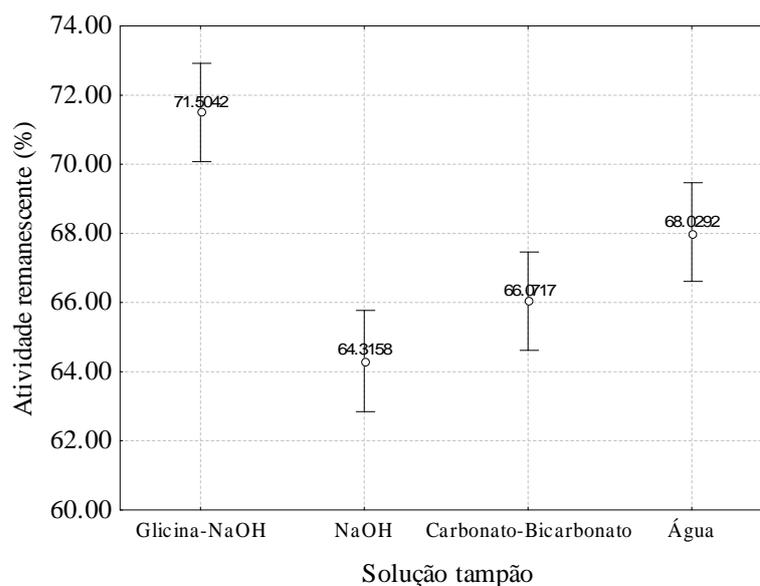


Figura 4.6. Efeito do tipo de tampão sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado.

Vários trabalhos na literatura comprovam que os poli-hidroxiálcoois (alditóis) tem efeito positivo sobre a estabilidade enzimática. E consta na literatura que esse efeito está associado ao número de grupos hidroxilas, por exemplo: glicerol < xilitol < sorbitol (Lemos *et al.*, 2000, George *et al.*, 2001). A redução na atividade ou completa inativação após algum período de incubação ocorre quando não são adicionados estabilizantes, independente da enzima, assim a adição de estabilizantes possibilita o uso das enzimas em processos

industriais com condições operacionais extremas. A adição de estabilizantes ocasiona uma variedade de efeitos na superfície da molécula da proteína e no estado de ionização da enzima, mudando a relação entre pH e estabilidade.

O teste de Tukey realizado sobre o tipo de estabilizante é mostrado na Tabela 4.13 e dos grupos homogêneos na Tabela 4.14. Observa-se a existência de dois grupos distintos (ausente e glicerol) e dois grupos homogêneos (sorbitol e xilitol). Com base nestes resultados pode-se afirmar que o efeito do sorbitol e xilitol apresentam os maiores valores de atividade, mas se confundem entre si e não se pode afirmar que são distintos. Já os resultados do glicerol e da água são únicos, e apresentam o segundo e terceiro maiores valores, respectivamente. O efeito do aumento na estabilidade pode ser conseguido com o aumento da concentração de poliols (COBOS e ESTRADA, 2003).

Tabela 4.13. Teste de Tukey aplicado às médias do tipo de estabilizante utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado.

Estabilizante [1 M]	{1} 75,571	{2} 75,447	{3} 64,248	{4} 54,656
Xilitol	-	0,999350	1,65E-4	1,65E-4
Sorbitol	0,999350	-	1,65E-4	1,65E-4
Glicerol	1,65E-4	1,65E-4	-	1,65E-4
Ausente	1,65E-4	1,65E-4	1,65E-4	-

Tabela 4.14. Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos do tipo de estabilizante utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado.

Estabilizante [1 M]	Atividade remanescente (%)	1	2	3
Ausente	54,65583		****	
Glicerol	64,24750			****
Sorbitol	75,44667	****		
Xilitol	75,57083	****		

Em trabalhos similares (Singh *et al.*, 2000) foi constatado que a xilanase de *T. lanuginosus* manteve 50% da atividade, sem adição de polióis, após 6 horas de incubação, pH 6,5, 70°C e quando adicionado 50% de sorbitol a xilanase da *T. lanuginosus* manteve 100% de atividade remanescente após 6 horas de incubação, enquanto com glicerol este resultado foi 90%.

A Figura 4.7 apresenta o efeito do fator tipo de estabilizante sobre a resposta. Observa-se que o xilitol e o sorbitol apresentam os maiores valores sobre a atividade, apesar de serem muito semelhantes. Já o glicerol apresenta o segundo maior efeito sobre a resposta, e o tipo ausente apresenta o menor valor de atividade remanescente (54,6558%).

O mesmo tipo de análise foi realizado para o efeito combinado do tipo de tampão e estabilizante pelo teste de Tukey aplicado às médias dos parâmetros (Tabela 4.15) e dos grupos homogêneos (Tabela 4.16), no qual se pode concluir que o único efeito distinto é da combinação entre solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, e sorbitol. Essa combinação também apresenta a maior média sobre a resposta atividade remanescente.

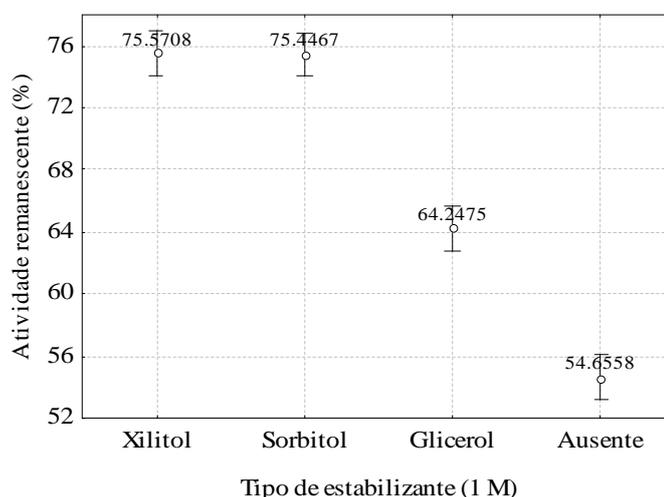


Figura 4.7. Efeito do tipo de estabilizante sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado.

A Figura 4.8 mostra o efeito combinado tampão e estabilizante sobre a atividade remanescente (%). Observa-se que a maior atividade é apresentada pela combinação solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, e sorbitol e a menor atividade remanescente com a combinação entre solução tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,0, na ausência de estabilizante. Deve-se considerar que o carbonato-bicarbonato promove efeito inibitório na atividade.

A ANOVA supõe que ocorre variância constante nas combinações dos níveis dos fatores; independência entre os ensaios e distribuição normal para a variação aleatória. Na Figura 4.9 observa-se que os valores residuais da combinação tampão e estabilizante, em

função da ordem em que foram realizados os experimentos, apresentam uma disposição dos erros de forma aleatória, ou seja, não seguem uma tendência de disposição linear ou curva, o que garante a independência dos erros. A verificação dessas suposições é realizada na Figura 4.10 que mostra que os resíduos seguem de maneira satisfatória a distribuição normal esperada.

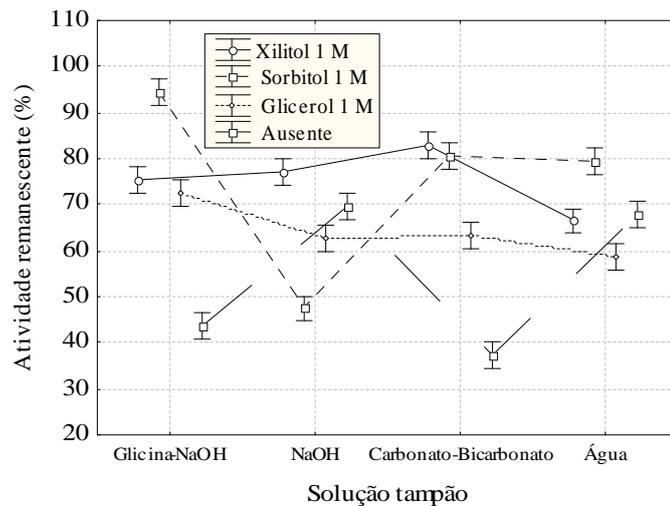


Figura 4.8. Efeito do estabilizante conforme o tipo de tampão utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado.

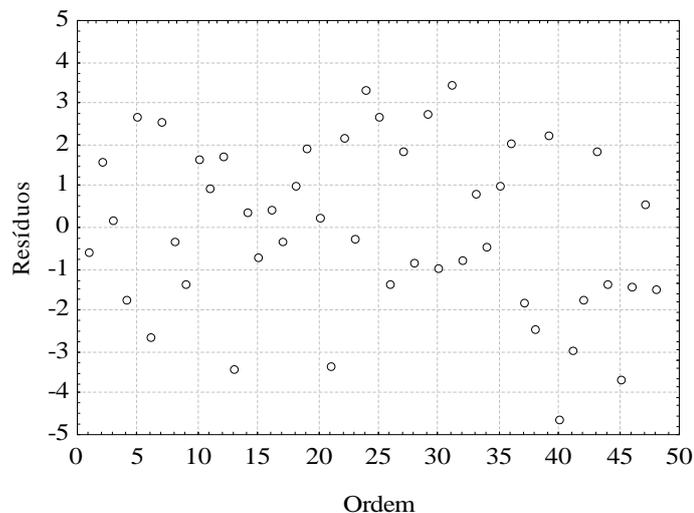


Figura 4.9. Resíduos em função da ordem, do efeito do tipo de estabilizante sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado.

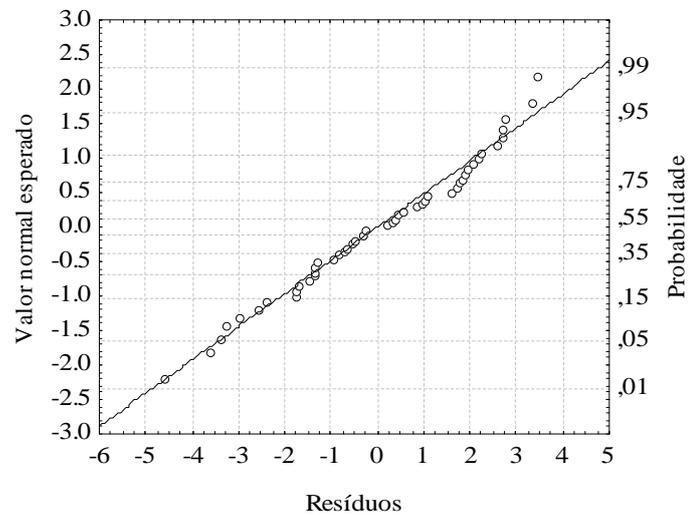


Figura 4.10. Gráfico da probabilidade normal esperada dos resíduos.

A Figura 4.11 mostra os resíduos em função dos valores preditos do efeito do tipo de estabilizante sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto estabilizado, nota-se que os resíduos não mostram nenhum padrão, o que junto com a aleatorização feita sobre os ensaios, mostra a independência entre estes.

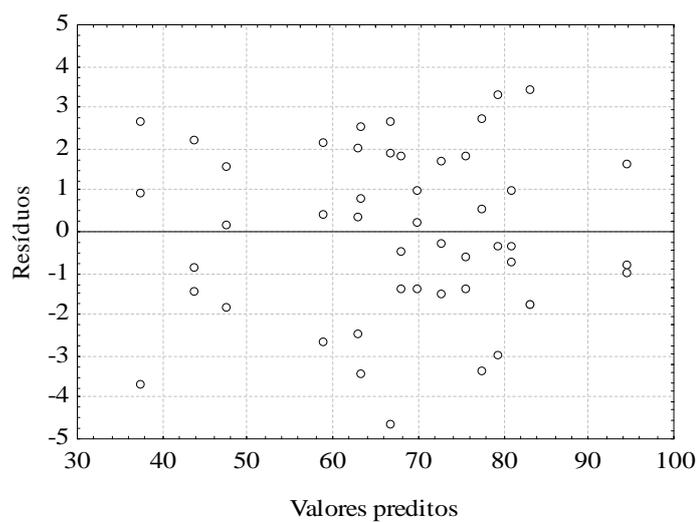


Figura 4.11. Resíduos em função dos valores preditos, do efeito do tipo de estabilizante sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado.

Tabela 4.15. Teste de Tukey aplicado às médias dos parâmetros tipo de tampão e de estabilizante utilizados sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado.

Tampão	Estabilizante	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}	{16}
		75,457	94,350	72,517	43,693	77,373	47,430	62,780	69,680	83,007	80,733	63,133	37,413	66,447	79,273	58,560	67,837
GNaOH	Xilitol	-	1,51E-4	0,977136	1,51E-4	0,999722	1,51E-4	1,75E-4	0,264331	0,040074	0,397822	1,94E-4	1,51E-4	6,219E-3	0,847307	1,51E-4	0,036819
GNaOH	Sorbitol	1,51E-4	-	1,51E-4	1,51E-4	1,51E-4	1,51E-4	1,51E-4	1,51E-4	3,63E-4	1,56E-4	1,51E-4	1,51E-4	1,51E-4	1,51E-4	1,51E-4	1,51E-4
GNaOH	Glicerol	0,977136	1,51E-4	-	1,51E-4	0,530614	1,51E-4	2,365E-3	0,983269	9,01E-4	0,017493	3,78E-3	1,51E-4	0,201930	0,099938	1,54E-4	0,589117
GNaOH	Ausente	1,51E-4	1,51E-4	1,51E-4	-	1,51E-4	0,865676	1,51E-4	1,51E-4	1,51E-4	1,51E-4	1,51E-4	0,164453	1,51E-4	1,51E-4	1,52E-4	1,51E-4
NaOH	Xilitol	0,999722	1,51E-4	0,530614	1,51E-4	-	1,51E-4	1,52E-4	0,033673	0,299203	0,934195	1,53E-4	1,51E-4	5,44E-4	0,999749	1,51E-4	3,084E-3
NaOH	Sorbitol	1,51E-4	1,51E-4	1,51E-4	0,865676	1,51E-4	-	1,51E-4	1,51E-4	1,51E-4	1,51E-4	1,51E-4	1,641E-3	1,51E-4	1,51E-4	4,42E-4	1,51E-4
NaOH	Glicerol	1,75E-4	1,51E-4	2,365E-3	1,51E-4	1,52E-4	1,51E-4	-	0,085303	1,51E-4	1,51E-4	1,000000	1,51E-4	0,880673	1,51E-4	0,737246	0,465657
NaOH	Ausente	0,264331	1,51E-4	0,983269	1,51E-4	0,033673	1,51E-4	0,085303	-	1,59E-4	4,77E-4	0,125117	1,51E-4	0,950575	2,861E-3	4,46E-4	0,999825
CB	Xilitol	0,040074	3,63E-4	9,01E-4	1,51E-4	0,299203	1,51E-4	1,51E-4	1,59E-4	-	0,998109	1,51E-4	1,51E-4	1,51E-4	0,866413	1,51E-4	1,51E-4
CB	Sorbitol	0,397822	1,56E-4	0,017493	1,51E-4	0,934195	1,51E-4	1,51E-4	4,77E-4	0,998109	-	1,51E-4	1,51E-4	1,52E-4	0,999990	1,51E-4	1,68E-4
CB	Glicerol	1,94E-4	1,51E-4	3,78E-3	1,51E-4	1,53E-4	1,51E-4	1,000000	0,125117	1,51E-4	1,51E-4	-	1,51E-4	0,940604	1,51E-4	0,624444	0,581372
CB	Ausente	1,51E-4	1,51E-4	1,51E-4	0,164453	1,51E-4	1,641E-3	1,51E-4	1,51E-4	1,51E-4	1,51E-4	1,51E-4	-	1,51E-4	1,51E-4	1,51E-4	1,51E-4
Água	Xilitol	6,219E-3	1,51E-4	0,201930	1,51E-4	5,44E-4	1,51E-4	0,880673	0,950575	1,51E-4	1,52E-4	0,940604	1,51E-4	-	1,70E-4	0,026533	0,999995
Água	Sorbitol	0,847307	1,51E-4	0,099938	1,51E-4	0,999749	1,51E-4	1,51E-4	2,861E-3	0,866413	0,999990	1,51E-4	1,51E-4	1,70E-4	-	1,51E-4	3,36E-4
Água	Glicerol	1,51E-4	1,51E-4	1,54E-4	1,52E-4	1,51E-4	4,42E-4	0,737246	4,46E-4	1,51E-4	1,51E-4	0,624444	1,51E-4	0,026533	1,51E-4	-	4,364E-3
Água	Ausente	0,036819	1,51E-4	0,589117	1,51E-4	3,084E-3	1,51E-4	0,465657	0,999825	1,51E-4	1,68E-4	0,581372	1,51E-4	0,999995	3,36E-4	4,364E-3	-

*MQ = 5,9153, GL = 32,000; CB = carbonato – bicarbonato; Glicina-NaOH = GNaOH.

Tabela 4.16. Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos do tipo de estabilizante utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado.

Solução tampão	Estabilizante	AR (%)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CB	Ausente	37,41333	****									
GNaOH	Ausente	43,69333	****	****								
NaOH	Sorbitol	47,43000		****								
Água	Glicerol	58,56000			****							
NaOH	Glicerol	62,78000			****	****						
CB	Glicerol	63,13333			****	****						
Água	Xilitol	66,44667				****	****					
Água	Ausente	67,83667				****	****					
NaOH	Ausente	69,68000				****	****	****				
GNaOH	Glicerol	72,51667					****	****	****			
GNaOH	Xilitol	75,45667						****	****	****		
NaOH	Xilitol	77,37333							****	****	****	
Água	Sorbitol	79,27333							****	****	****	
CB	Sorbitol	80,73333								****	****	
CB	Xilitol	83,00667									****	
GNaOH	Sorbitol	94,35000										****

* CB = Carbonato-Bicarbonato 0,1 M, pH 9,0; GNaOH = Glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0; Água pH 6,0; NaOH pH 9,0; AR = Atividade Remanescente.

4.5.1. Efeito da Concentração de Estabilizante

Na literatura são utilizadas concentrações na ordem de 1 a 10 M como na ordem de 5 a 50% massa/massa (Duarte *et al.*, 2000; Lemos *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2000; George *et al.*, 2001; Cobos e Estrada, 2003). A adição de sorbitol a xilanase de *Thermomonospora* sp. em pH 7,0, a 80°C, manteve a proteção máxima na concentração de 4 M, pois sem a adição de poliol a enzima apresentava a essa temperatura tempo de meia-vida de 9 minutos (George *et al.*, 2001). A adição de sorbitol e o xilitol, 2 M, à endoxilanase de *Aspergillus awamori* após 300 minutos a 52°C em pH 5,0, manteve aproximadamente 60% da atividade inicial, enquanto o controle foi inferior a 20% (Lemos *et al.*, 2000). A xilanase de *Trichoderma reesei* QM 9414, a 60°C apresenta tempo de meia-vida, sem poliol, de 2,7 minutos e na presença de 2M

de eritritol, xilitol e sorbitol foi verificado que o tempo aumentou 8, 32 e 112 vezes, respectivamente (COBOS e ESTRADA, 2003).

Trabalhos anteriores, também comprovaram que tanto o efeito termoestabilizante do poliol adicionado é proporcional ao tamanho molecular, ou seja, correlacionado ao número de grupos hidroxila por molécula de poliol quanto o aumento de concentração do poliol correspondente. Esse efeito da termoestabilidade devido ao tamanho molecular do estabilizante também foi verificado neste trabalho, pois o sorbitol apresenta o maior tamanho molecular (COBOS e ESTRADA, 2003; GEORGE *et al.*, 2001).

Para avaliar se existe diferença significativa entre as concentrações de sorbitol empregadas para estabilizar o caldo, os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística em dois grupos de concentração de sorbitol distintos: o primeiro com a concentração 0,5 e 1,0 M; o segundo com a concentração 1,0 e 2,0 M. Adotou-se este método para análise, pois seria impossível fazer a análise estatística por apresentarem intervalo de proporção diferente (0,5 para 1,0 M a proporção aumentada é 0,5; 1,0 para 2,0 M a proporção aumentada é 1,0).

A análise realizada para as concentrações de sorbitol 0,5 e 1 M apresentou boa correlação (aproximadamente 0,95) mostrando apenas efeitos lineares, principalmente do tempo. Mas para qualquer transformação aplicada aos dados, a falta de ajuste continuou alta. Diferentemente do que ocorreu para a concentração de 1,0 e 2,0 M, que será apresentado no próximo item (4.5.1.2). Nessa análise percebe-se que a falta de ajuste do modelo foi ocasionada pelo planejamento experimental ser inadequado, pois os dados não se ajustaram a nenhum modelo devido aos resíduos serem muito grandes e tendenciosos, não houve uma dispersão destes resíduos. Os dados foram analisados pelo software STATISTICA 7.

4.5.1.1. Análise para a Concentração de 0,5 e 1,0 M de Sorbitol

A Tabela 4.17 mostra o planejamento experimental utilizado para determinar a melhor concentração do estabilizante sorbitol na estabilidade da atividade xilanosídica. A Tabela 4.18 apresenta a estatística descritiva das médias, desvio padrão e o efeito do desvio padrão sobre o intervalo de confiança das médias, para o caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. Verifica-se que as amostras apresentaram elevados valores de erro padrão e que o intervalo de confiança nessas amostras tornou-se muito elevado.

Tabela 4.17. Resposta obtida no planejamento fatorial completo quatro fatores, misto de 2 e 3 níveis, para determinar a melhor concentração do estabilizante sorbitol, 0,5 e 1,0 M, para o caldo bruto centrifugado, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Sorbitol 0,5 M				Sorbitol 1,0 M			
Umectante (g/L)	Tipo de agitação	Tempo (min)	AR (%)	Umectante (g/L)	Tipo de agitação	Tempo (min)	AR (%)
5	com	60	52,01	5	sem	60	85,80
5	com	60	52,32	5	sem	60	85,91
3	com	60	55,36	5	sem	50	89,41
5	sem	60	56,08	5	sem	40	89,64
3	com	60	57,75	5	sem	50	89,65
3	sem	60	58,27	5	sem	40	90,00
3	sem	60	58,52	5	sem	50	90,81
5	com	50	59,74	5	sem	40	90,93
3	sem	60	59,84	5	sem	60	92,21
5	sem	50	60,20	3	sem	50	92,42
5	com	50	60,40	3	sem	50	92,57
5	com	60	61,29	3	sem	40	93,28
3	com	50	61,61	3	sem	40	93,36
3	com	50	61,81	3	com	40	93,58
3	com	60	62,36	3	sem	60	93,75
5	sem	60	62,61	3	sem	40	93,79
5	com	50	62,78	3	sem	60	93,96
5	com	40	63,32	3	sem	50	94,26
5	sem	60	63,62	3	com	40	94,44
3	com	50	63,72	3	com	50	94,58
3	sem	50	63,84	3	com	60	94,73
3	sem	50	64,38	3	com	60	95,54
3	sem	50	65,41	3	com	50	95,54
5	sem	50	66,06	3	com	60	95,63
5	sem	40	66,21	5	com	40	95,84
3	sem	40	67,51	3	com	50	96,35
3	sem	40	67,67	3	sem	60	96,48
5	com	40	67,69	3	com	40	96,49
5	sem	50	69,08	5	com	40	97,90
5	com	40	69,25	5	com	40	98,87
3	sem	40	69,78	5	com	50	104,16
3	com	40	71,40	5	com	50	107,92
3	com	40	72,27	5	com	50	108,40
3	com	40	73,71	5	com	60	110,15
5	sem	40	74,05	5	com	60	111,15
5	sem	40	75,12	5	com	60	111,85

* AR = Atividade Remanescente.

A justificativa para esse comportamento observado reside na dificuldade da aplicação do método de determinação de atividade (Miller, 1959), pois a presença do umectante nas amostras, conferiu opacidade e assim dificultou a reprodutibilidade dos resultados.

Tabela 4.18. Estatística descritiva da melhor combinação de umectante, tipo de agitação, tempo de incubação e concentração do estabilizante sorbitol (0,5 e 1,0 M) para o caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Umectante (g/L)	Tipo de agitação	Sorbitol (M)	Tempo (min)	N	Média	Erro padrão	IC -95,00%	IC +95,00%
3	sem	0,5	40	3	68,32	0,73146	65,17	71,47
3	sem	0,5	50	3	64,54	0,46052	62,56	66,52
3	sem	0,5	60	3	58,88	0,48704	56,78	60,97
3	sem	1,0	40	3	93,48	0,15836	92,80	94,16
3	sem	1,0	50	3	93,08	0,58992	90,55	95,62
3	sem	1,0	60	3	94,73	0,87710	90,96	98,50
3	com	0,5	40	3	72,46	0,67357	69,56	75,36
3	com	0,5	50	3	62,38	0,67248	59,49	65,27
3	com	0,5	60	3	58,49	2,05432	49,65	67,33
3	com	1,0	40	3	94,84	0,86314	91,12	98,55
3	com	1,0	50	3	95,49	0,51157	93,29	97,69
3	com	1,0	60	3	95,30	0,28618	94,07	96,53
5	sem	0,5	40	3	71,79	2,80870	59,71	83,88
5	sem	0,5	50	3	65,11	2,60677	53,90	76,33
5	sem	0,5	60	3	60,77	2,36306	50,60	70,94
5	sem	1,0	40	3	90,19	0,38432	88,54	91,84
5	sem	1,0	50	3	89,96	0,43226	88,10	91,82
5	sem	1,0	60	3	87,97	2,11857	78,86	97,09
5	com	0,5	40	3	66,75	1,77475	59,12	74,39
5	com	0,5	50	3	60,97	0,92321	57,00	64,95
5	com	0,5	60	3	55,21	3,04298	42,11	68,30
5	com	1,0	40	3	97,54	0,89335	93,69	101,38
5	com	1,0	50	3	106,83	1,34051	101,06	112,59
5	com	1,0	60	3	111,05	0,49329	108,93	113,17

* IC = Intervalo de Confiança.

Na Tabela 4.19 é apresentado o teste de Tukey para a concentração de umectante utilizado sobre a atividade remanescente (%), em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH

9,0. Percebe-se que a concentração do umectante não promove grande diferença sobre a atividade. Na Tabela 4.20, percebe-se que a mudança da concentração de sorbitol de 0,5 M para 1,0 M representou uma grande mudança na atividade remanescente (%) em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, como esperado, indicando que a maior concentração de sorbitol melhorou a estabilidade da enzima. A Tabela 4.21 apresenta o teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos do tipo de agitação na atividade remanescente (%) em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. Verifica-se que apresenta diferença entre as respostas.

Na Tabela 4.22, verifica-se que os dados estão muito tendenciosos quanto ao erro, dificultando a análise, pois o efeito real do tempo 60 minutos pode ser encontrado em qualquer ponto do seu enorme intervalo de confiança. Como esperado ocorre um decréscimo, constante (linear), da atividade remanescente (%) com o tempo, possibilitando a afirmação de que todas as respostas para todos os tempos avaliados são estatisticamente diferentes, sendo que na média o tempo de 60 minutos apresenta a menor atividade.

A Figura 4.12 apresenta a análise da interação entre os efeitos umectante e tempo na atividade remanescente (%) em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. Observa-se que quanto maior o tempo menor é a atividade remanescente, porém quando se considera o mesmo tempo variando as concentrações de umectante, verifica-se que a atividade remanescente é maior com 5 g/L de umectante, para 50 e 60 minutos. Na Figura 4.13 a análise da interação entre os efeitos tipo de agitação e tempo, na atividade remanescente (%) em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, observa-se que a presença de agitação tem efeito positivo. A Figura 4.14 apresenta a análise da interação entre os efeitos concentração de sorbitol e tempo, na atividade remanescente (%) em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. Nota-se que o maior efeito, dentre umectante, agitação e concentração de sorbitol, ocorre com a concentração de sorbitol, pois apresenta elevada inclinação.

Tabela 4.19. Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos do umectante utilizado sobre a atividade remanescente (%) em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Umectante (g/L)	Atividade remanescente (%)	1
3,0	79,33222	****
5,0	80,34528	****

Tabela 4.20. Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos da concentração de sorbitol utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Concentração sorbitol (M)	Atividade remanescente (%)	1	2
0,5	63,80667	****	
1,0	95,87083		****

Tabela 4.21. Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos do tipo de agitação utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Tipo de agitação	Atividade remanescente (%)	1	2
sem	78,23556	****	
com	81,44194		****

Tabela 4.22. Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos do tempo utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Tempo (min)	Atividade remanescente (%)	1	2	3
40	81,92083			****
50	79,79583		****	
60	77,79958	****		

A Figura 4.15 mostra a análise da interação entre três efeitos: agitação, umectante e tempo na atividade remanescente (%) do caldo bruto estabilizado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. Os resultados mostram que a atividade remanescente é mais sensível a agitação e concentração de umectante, enquanto o tempo demonstra menor importância sob as condições estudadas.

A Figura 4.16 apresenta a interação entre os efeitos concentração de sorbitol, umectante e tempo e na Figura 4.17 os efeitos de interação entre a concentração de sorbitol, agitação e tempo. Observa-se, em ambas as figuras que a atividade remanescente (%) é mais sensível à concentração de sorbitol.

A Figura 4.18 mostra a análise de interação entre todos os efeitos: umectante, agitação, concentração de sorbitol e tempo. Nota-se, para 0,5 M de sorbitol, que existe efeito sinérgico positivo para o umectante e a agitação, no tempo 40 minutos, pois ocorre uma

mudança significativa na inclinação das linhas. Para 1,0 M de sorbitol, as linhas não são paralelas e apesar de não se cruzarem, indicam efeito de interação.

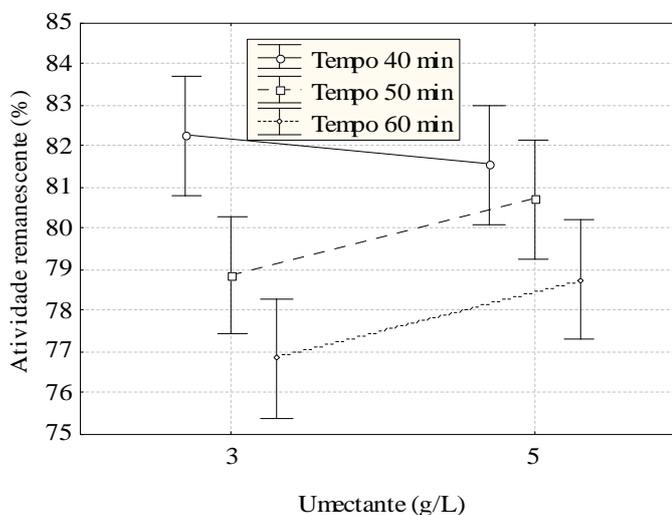


Figura 4.12. Análise da interação entre os efeitos umectante e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. [F(2,48) = 2,1461, p = 0,12803]

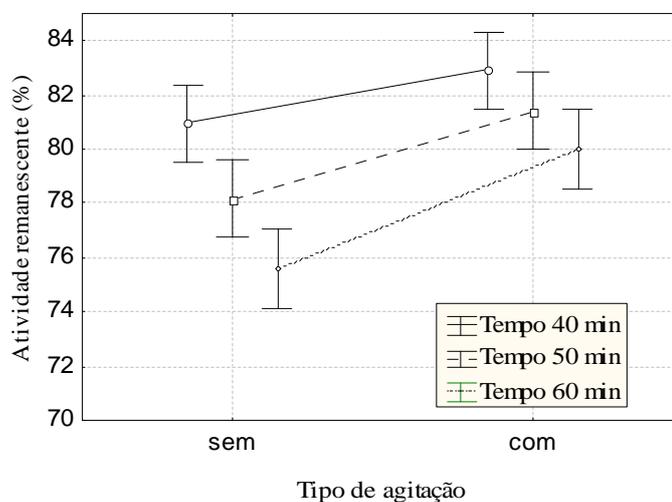


Figura 4.13. Análise da interação entre os efeitos tipo de agitação e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. [F(2,48) = 1,4820, p = 0,23739]

A Tabela 4.23 apresenta a análise de variância dos efeitos umectante, ausência ou presença de agitação, concentração de sorbitol e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto estabilizado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. Observa-se que a concentração de 0,5 M e 1,0 M de sorbitol o efeito da variação da quantidade de umectante

não foi significativa sobre a atividade, a um alfa de 5% ($p > 5\%$). Já os fatores agitação, sorbitol e tempo se mostraram significativos. Dentre as interações relevantes sobre a atividade remanescente em tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, estão: agitação com sorbitol, sorbitol com tempo, agitação com sorbitol e tempo. O efeito do umectante e das interações umectante x tempo, agitação x tempo, umectante x sorbitol x tempo, e o umectante x sorbitol x agitação x tempo não foram significativos.

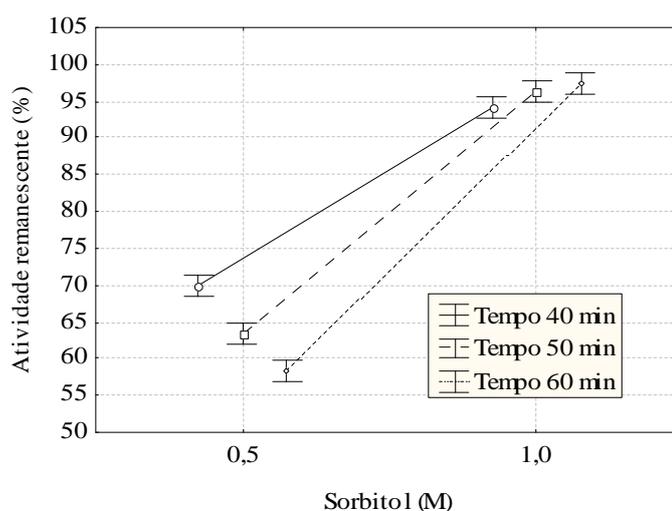


Figura 4.14. Análise da interação entre os efeitos concentração de sorbitol e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. [F(2,48) = 53,462, $p = 0,00000$]

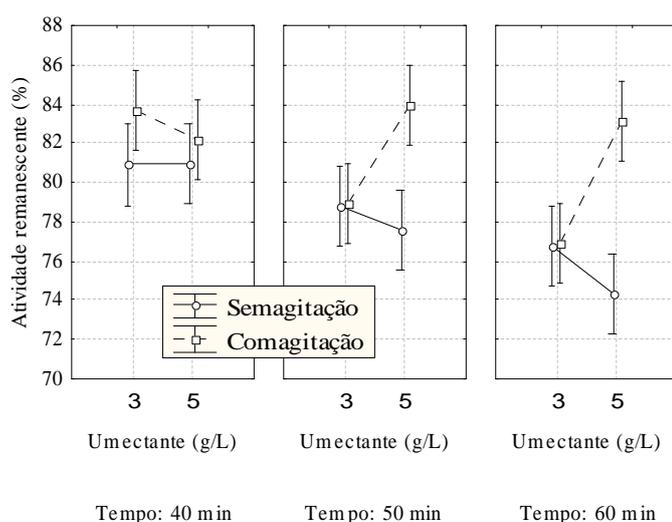


Figura 4.15. Análise da interação entre os efeitos tipo de agitação, umectante e tempo sobre a atividade remanescente em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. [F(2, 48) = 6,9704, $p = 0,00220$]

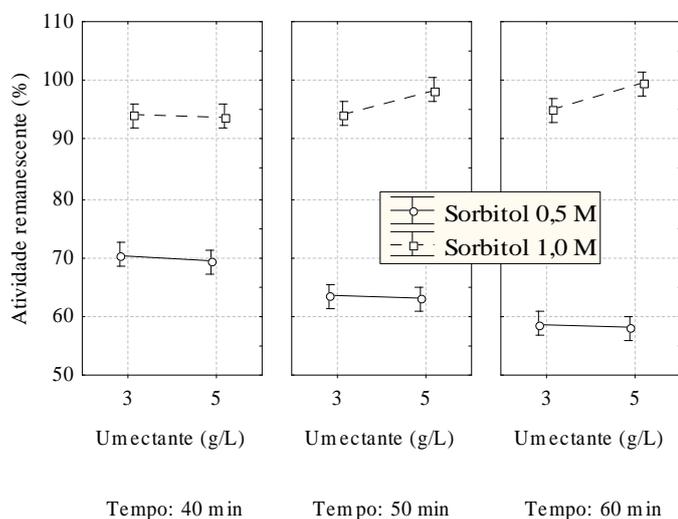


Figura 4.16. Análise da interação entre os efeitos da concentração de sorbitol, umectante e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. [F(2, 48) = 1,3413, p = 0,27113]

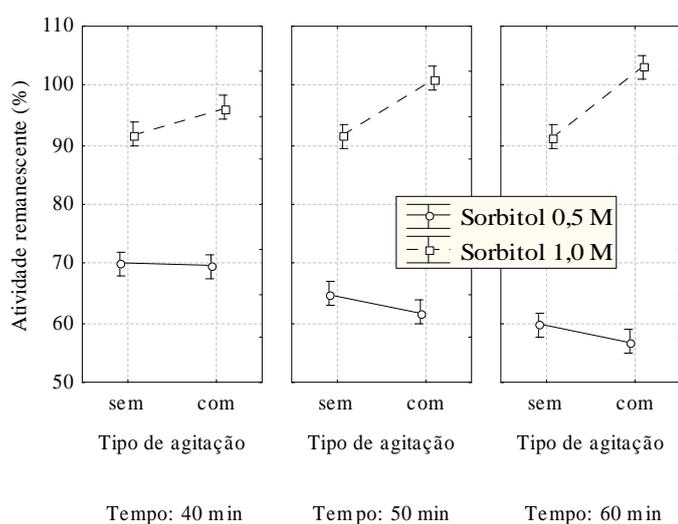


Figura 4.17. Análise da interação entre os efeitos da concentração de sorbitol, tipo de agitação e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. [F(2, 48) = 6,7721, p = 0,00257]

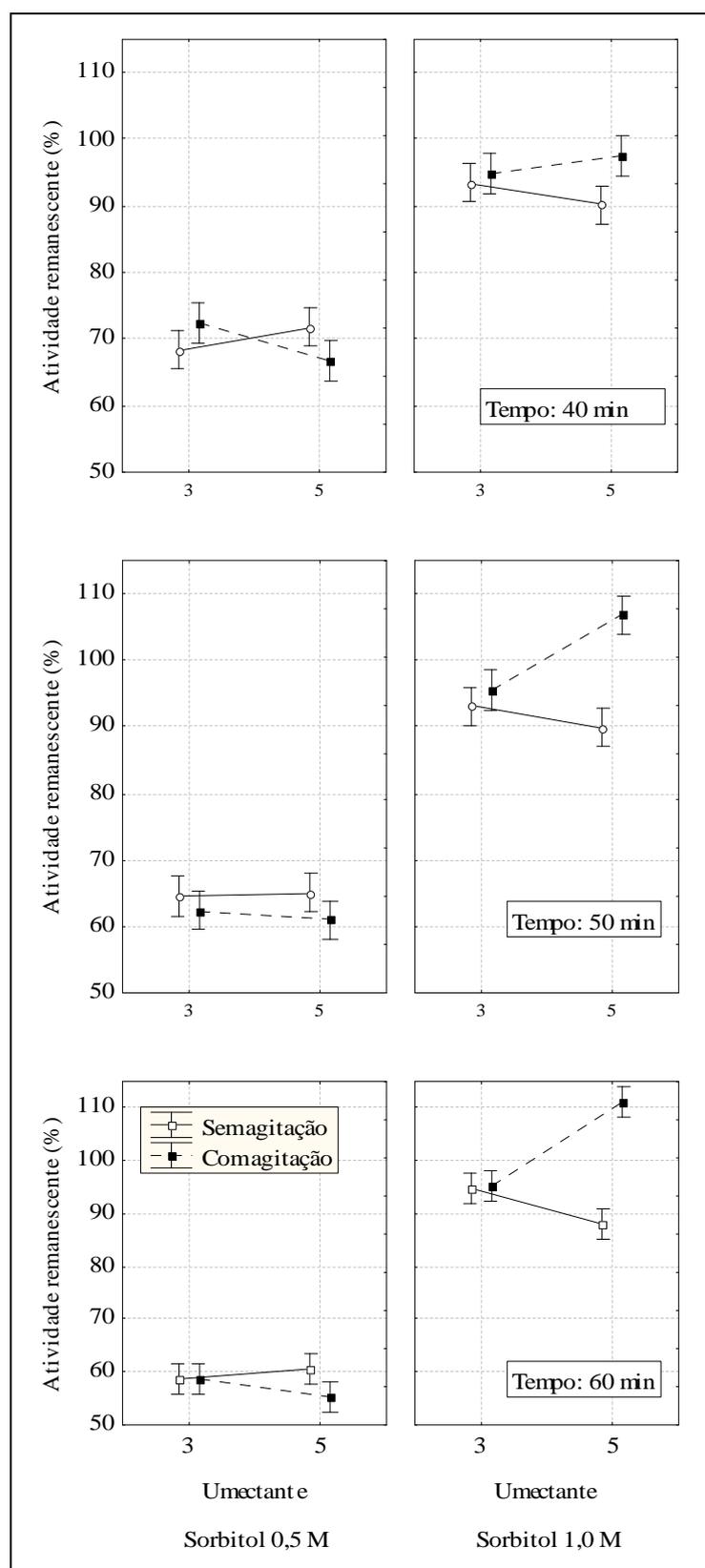


Figura 4.18. Análise da interação entre todos os efeitos sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. [F(2, 48) = 2,8739, p = 0,06624]

A Figura 4.19 apresenta os resíduos em função dos valores preditos da atividade remanescente (%) para o efeito umectante, agitação, concentração de sorbitol e tempo, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. Percebe-se que existe diferença entre as médias do sorbitol 0,5 M e 1,0 M e as variâncias.

Tentou-se realizar a verificação das suposições: as observações são independentes; a variável dependente deve ter distribuição normal; homogeneidade de variâncias. As observações são independentes, pois houve aleatorização dos dados. A homogeneidade de variâncias foi um pouco afetada. Os resíduos para 0,5 M estão muito mais dispersos do que os resíduos para 1,0 M de sorbitol e isto prejudica a análise.

Tabela 4.23. ANOVA da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em função da combinação para combinação de todos os efeitos em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Causa de variação	GL	SQ	QM	F	p
Constante	1	458944,30	458944,30	74123,91	0,00E-01
Umectante	1	18,50	18,50	2,98	9,05E-02
Agitação	1	185,10	185,10	29,89	1,62E-06
Sorbitol	1	18506,00	18506,00	2988,90	0,00E-01
Tempo	2	203,90	101,90	16,46	3,59E-06
Umectante*Agitação	1	88,60	88,60	14,31	4,30E-04
Umectante*Sorbitol	1	55,50	55,50	8,97	4,33E-03
Agitação*Sorbitol	1	524,60	524,60	84,73	3,55E-12
Umectante*Tempo	2	26,60	13,30	2,15	1,28E-01
Agitação*Tempo	2	18,40	9,20	1,48	2,37E-01
Sorbitol*Tempo	2	662,00	331,00	53,46	6,12E-13
Umectante*Agitação*Sorbitol	1	439,40	439,04	70,97	5,07E-11
Umectante*Agitação*Tempo	2	86,30	43,20	6,97	2,20E-03
Umectante*Sorbitol*Tempo	2	16,60	8,30	1,34	2,71E-01
Agitação*Sorbitol*Tempo	2	83,90	41,90	6,77	2,57E-03
Umectante*Agitação*Sorbitol*Tempo	2	35,60	17,80	2,87	6,62E-02
Erro/Resíduos	48	297,20	6,20		
Total	71	21248,10			

* GL = Graus de Liberdade, SQ = Soma dos Quadrados, QM = Quadrado Médio.

A Figura 4.20 mostra o diagrama de dispersão das médias e desvios padrões da atividade remanescente (%) para o efeito umectante, agitação, concentração de sorbitol e tempo, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. Observa-se que não existe correlação entre as médias e os desvios padrões, ou seja, não ocorre aumento da dispersão dos dados quando as médias aumentam, porém observa-se que o desvio padrão é elevado entre o intervalo de 50 e 80% de atividade remanescente média, correspondente à menor concentração de sorbitol testada.

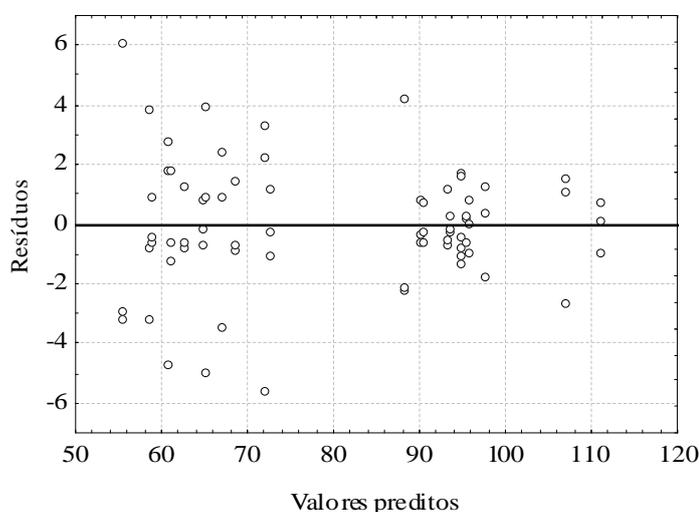


Figura 4.19. Resíduos em função dos valores preditos da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, para todos os efeitos.

A Figura 4.21 apresenta o perfil para os valores preditos e desejabilidade da atividade remanescente (%) para o efeito umectante, agitação, concentração de sorbitol e tempo. Verifica-se que o máximo da resposta é obtido na concentração de umectante equivalente a 5 g/L, com agitação, sorbitol 1,0 M e tempo de 60 minutos, condições nas quais se deve obter um valor de 111% na reposta (atividade enzimática).

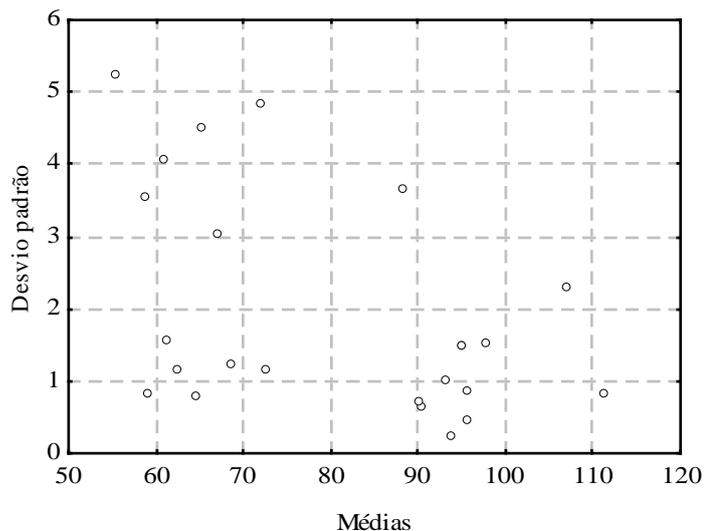


Figura 4.20. Diagrama de dispersão: médias e desvios padrões da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado para todos os efeitos, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

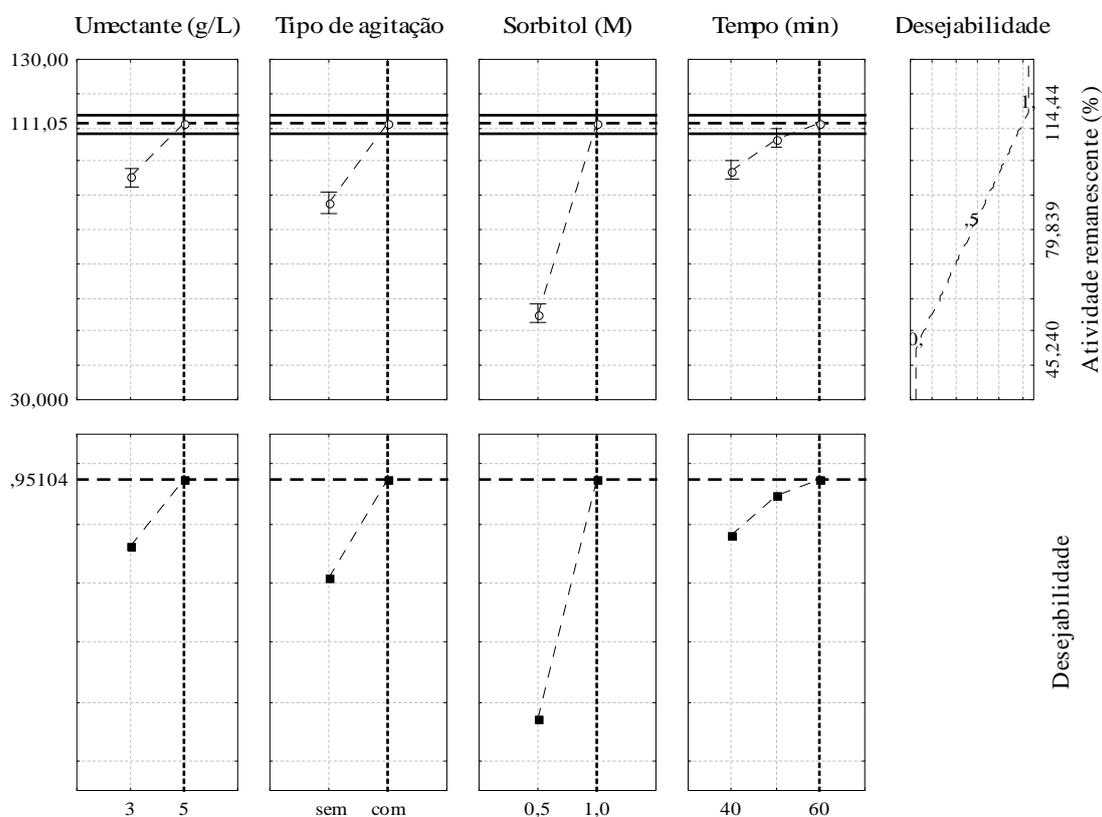


Figura 4.21. Perfil para os valores preditos e desejabilidade da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado para todos os efeitos em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

A Tabela 4.24 apresenta o teste de Tukey aplicado às médias da atividade remanescente (%), em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, para os efeitos umectante, agitação, concentração de sorbitol e tempo.

Tabela 4.24. Teste de Tukey aplicado às médias da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado para os tratamentos, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Umectante (g/L)	Tipo de agitação	Sorbitol (M)	Tempo (min)	AR (%)	1	2	3	4	5	6	7	8
5	com	0,5	60	55,2067	****							
3	com	0,5	60	58,4900	****	****						
3	sem	0,5	60	58,8767	****	****						
5	sem	0,5	60	60,7700	****	****	****					
5	com	0,5	50	60,9733	****	****	****					
3	com	0,5	50	62,3800	****	****	****					
3	sem	0,5	50	64,5433		****	****	****				
5	sem	0,5	50	65,1133		****	****	****	****			
5	com	0,5	40	66,7533			****	****	****			
3	sem	0,5	40	68,3200			****	****	****			
5	sem	0,5	40	71,7933				****	****			
3	com	0,5	40	72,4600					****			
5	sem	1,0	60	87,9733						****		
5	sem	1,0	50	89,9567						****	****	
5	sem	1,0	40	90,1900						****	****	
3	sem	1,0	50	93,0833						****	****	
3	sem	1,0	40	93,4767						****	****	
3	sem	1,0	60	94,7300						****	****	
3	com	1,0	40	94,8367						****	****	
3	com	1,0	60	95,3000						****	****	
3	com	1,0	50	95,4900						****	****	
5	com	1,0	40	97,5367							****	
5	com	1,0	50	106,8267								****
5	com	1,0	60	111,0500								****

* AR = Atividade Remanescente.

O teste de Tukey de comparação de médias serve como indicação de onde se encontra o máximo da reposta. Os resultados de máximo são semelhantes aos obtidos no

intervalo 1,0 e 2,0 M, apresentados no item 4.5.1.2. O teste de Tukey mostra que os menores valores da variável resposta (atividade remanescente - %) foram obtidos nos casos em que a concentração de sorbitol foi 0,5 M, com agitação, no tempo de 60 minutos, com 3 ou 5 g/L de umectante, embora tenha ocorrido muita coincidência entre o intervalo de confiança. Já o valor máximo da resposta aparece nitidamente para 5 g/L de umectante, com agitação, 1,0 M de sorbitol nos tempos de 50 ou 60 minutos. Esses valores não se confundem com mais nenhum outro intervalo de confiança.

Com base na função de desejabilidade obtida, mostrada na Figura 4.20, se observa a necessidade de fazer dois experimentos usando estes dois últimos pontos para se poder afirmar, com certeza, que o máximo é no tempo de 60 e não 50 minutos, pois como foi observado na análise do efeito do tempo, o intervalo de confiança e o desvio padrão no tempo de 60 minutos são muito elevados, o que pode ter afetado a obtenção dos ótimos.

4.5.1.2. Análise para a Concentração de 1,0 e 2,0 M de Sorbitol

A análise para avaliar a influência da concentração 1,0 ou 2,0 M de sorbitol na estabilidade do caldo bruto centrifugado foi realizada pelo planejamento fatorial completo, 4 fatores, misto de 2 e 3 níveis. Foi realizada a análise sobre o R do modelo considerando as replicatas como blocos e verificou-se que não foi significativo o efeito do bloco sobre o modelo. Então foi considerada a ausência e presença de agitação, como bloco, também se verificou que não foi significativo o efeito do bloco sobre o modelo, e continuou com baixo ajuste. Usando 3 ou 5 g/L de umectante como blocos, foi observado efeito do bloco significativo sobre o modelo, embora continuasse a falta de ajuste. Será verificado a seguir que considerar o umectante como bloco não é muito correto, já que é um fator quantitativo, mensurável e controlável.

Foram várias as transformações algébricas usadas sobre a variável resposta na tentativa de melhorar o ajuste da curva, não foi obtido êxito com nenhuma das transformações e nem com a resposta original quanto a um bom ajuste do modelo. Dentre as transformações testadas pode-se destacar $\log(y)$, $\log(1/y)$, Raiz y , $\tan(y)$, $\cos y$, $\sqrt{\log(y)}$, $y^{1/3}$. A falta de ajuste do modelo é considerável, sendo o R ajustado máximo encontrado igual a 0,68 para a transformação $y^{1/3}$, um valor muito baixo para um ajuste de curva, não foi possível estabelecer uma superfície de resposta sobre as variáveis neste intervalo entre 1,0 M e 2,0 M de sorbitol. Isso provavelmente se deve à grande dispersão dos dados (alto desvio padrão), ou até mesmo pela inadequação do planejamento utilizado, ou pela combinação de ambos.

Talvez um planejamento central composto com ponto central em 1,0 M fosse mais adequado para a obtenção de um modelo mais apropriado.

Ao analisar a dispersão dos dados, médias das replicatas e seus respectivos desvios padrão, mostrado na Figura 4.22, percebe-se uma grande dispersão e variabilidade dos dados, sendo o maior desvio padrão obtido de 3,67. Embora a variabilidade dos resíduos deva existir para um bom ajuste de modelo, uma variabilidade tão grande como esta dificulta o ajuste do modelo. O ideal é que os desvios padrão oscilassem de maneira aleatória em torno do zero. Como a transformação da variável resposta não causou uma mudança significativa sobre os resultados obtidos na análise de variância e ajuste de curva, optou-se em trabalhar com a variável resposta original, sem qualquer transformação.

Logo, os resultados apresentados referem-se à melhor condição obtida para a variável resposta na sua forma original. Como não foi possível determinar um modelo adequado, foi considerado mais adequado determinar quais os fatores que afetam a resposta de interesse. O que é feito pela análise de variância apresentada a seguir.

A Tabela 4.25 apresenta o planejamento experimental utilizado para determinar a melhor concentração do estabilizante sorbitol, 1,0 ou 2,0 M, capaz de garantir a estabilidade térmica da enzima.

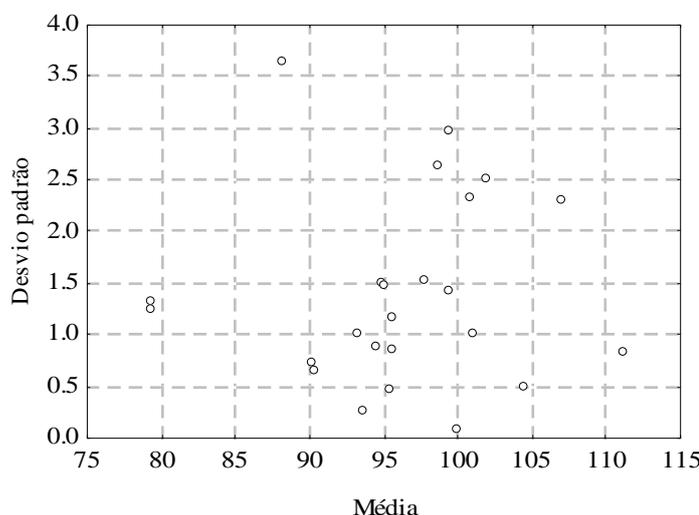


Figura 4.22. Diagrama de dispersão: médias e desvios padrões da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, para todos os efeitos.

A Tabela 4.26 mostra a estatística descritiva dos parâmetros umectante, tipo de agitação, concentração de sorbitol e tempo sobre a atividade remanescente. Contêm as médias

das replicatas, os desvios padrão, e o intervalo de confiança dessas médias, de onde se pode ver o efeito do desvio padrão sobre o intervalo de confiança.

Embora os diferentes tipos de obtenção das médias (ponderadas e não ponderadas) resultem no mesmo valor de médias, o desvio do padrão das médias não é o mesmo nos dois casos, sendo que na média ponderada pode-se ver o efeito do aumento da variabilidade do erro quando se muda de um nível para outro da mesma variável, o que se reflete no valor do intervalo de confiança. Os gráficos que serão apresentados, a seguir, mostram o intervalo de confiança de cada média, não ponderada.

Tabela 4.25. Resposta do planejamento fatorial completo 4 fatores, misto de 2 e 3 níveis, utilizado para determinar a melhor concentração do estabilizante sorbitol, 1,0 ou 2,0 M, para o caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Ensaio	Umectante (g/L)	Tipo de agitação	Sorbitol (M)	Tempo (min)	AR (%)
1	3,0	com	1,0	40,0	94,44
	3,0	com	1,0	40,0	93,58
	3,0	com	1,0	40,0	96,49
2	5,0	com	1,0	40,0	97,90
	5,0	com	1,0	40,0	98,87
	5,0	com	1,0	40,0	95,84
3	3,0	sem	1,0	40,0	93,28
	3,0	sem	1,0	40,0	93,79
	3,0	sem	1,0	40,0	93,36
4	5,0	sem	1,0	40,0	89,64
	5,0	sem	1,0	40,0	90,00
	5,0	sem	1,0	40,0	90,93
5	3,0	com	2,0	40,0	104,11
	3,0	com	2,0	40,0	103,84
	3,0	com	2,0	40,0	104,85
6	5,0	com	2,0	40,0	101,18
	5,0	com	2,0	40,0	101,57
	5,0	com	2,0	40,0	99,64
7	3,0	sem	2,0	40,0	99,66
	3,0	sem	2,0	40,0	95,53
	3,0	sem	2,0	40,0	100,47
8	5,0	sem	2,0	40,0	98,39
	5,0	sem	2,0	40,0	102,51
	5,0	sem	2,0	40,0	96,67
9	3,0	com	1,0	50,0	95,54
	3,0	com	1,0	50,0	94,58
	3,0	com	1,0	50,0	96,35
10	5,0	com	1,0	50,0	108,40
	5,0	com	1,0	50,0	107,92

Continuação da Tabela 4.25.

10	5,0	com	1,0	50,0	104,16
	3,0	sem	1,0	50,0	94,26
11	3,0	sem	1,0	50,0	92,57
	3,0	sem	1,0	50,0	92,42
	5,0	sem	1,0	50,0	89,41
12	5,0	sem	1,0	50,0	89,65
	5,0	sem	1,0	50,0	90,81
	3,0	com	2,0	50,0	79,47
13	3,0	com	2,0	50,0	77,83
	3,0	com	2,0	50,0	80,47
	5,0	com	2,0	50,0	96,74
14	5,0	com	2,0	50,0	95,16
	5,0	com	2,0	50,0	94,40
	3,0	sem	2,0	50,0	98,04
15	3,0	sem	2,0	50,0	102,63
	3,0	sem	2,0	50,0	101,30
	5,0	sem	2,0	50,0	100,80
16	5,0	sem	2,0	50,0	99,31
	5,0	sem	2,0	50,0	97,93
	3,0	com	1,0	60,0	95,54
17	3,0	com	1,0	60,0	95,63
	3,0	com	1,0	60,0	94,73
	5,0	com	1,0	60,0	110,15
18	5,0	com	1,0	60,0	111,15
	5,0	com	1,0	60,0	111,85
	3,0	sem	1,0	60,0	93,75
19	3,0	sem	1,0	60,0	96,48
	3,0	sem	1,0	60,0	93,96
	5,0	sem	1,0	60,0	85,91
20	5,0	sem	1,0	60,0	92,21
	5,0	sem	1,0	60,0	85,80
	3,0	com	2,0	60,0	77,83
21	3,0	com	2,0	60,0	80,36
	3,0	com	2,0	60,0	79,12
	5,0	com	2,0	60,0	94,07
22	5,0	com	2,0	60,0	95,40
	5,0	com	2,0	60,0	93,67
	3,0	sem	2,0	60,0	99,35
23	3,0	sem	2,0	60,0	101,37
	3,0	sem	2,0	60,0	104,38
	5,0	sem	2,0	60,0	99,77
24	5,0	sem	2,0	60,0	99,89
	5,0	sem	2,0	60,0	99,66

* AR = Atividade Remanescente.

Tabela 4.26. Estatística descritiva da melhor combinação de umectante, tipo de agitação, tempo de incubação e concentração do estabilizante sorbitol (1,0 ou 2,0 M) sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Umectante (g/L)	Tipo de agitação	Sorbitol (M)	Tempo (min)	N	Média	Erro padrão	IC -95,00%	IC +95,00%
3	sem	1,0	40	3	93,4767	0,158360	92,80	94,16
3	sem	1,0	50	3	93,0833	0,589925	90,55	95,62
3	sem	1,0	60	3	94,7300	0,877097	90,96	98,50
3	sem	2,0	40	3	98,5533	1,529644	91,97	105,13
3	sem	2,0	50	3	100,6567	1,363504	94,79	106,52
3	sem	2,0	60	3	101,7000	1,461381	95,41	107,99
3	com	1,0	40	3	94,8367	0,863140	91,12	98,55
3	com	1,0	50	3	95,4900	0,511566	93,29	97,69
3	com	1,0	60	3	95,3000	0,286182	94,07	96,53
3	com	2,0	40	3	104,2667	0,301901	102,97	105,57
3	com	2,0	50	3	79,2567	0,769531	75,95	82,57
3	com	2,0	60	3	79,1033	0,730396	75,96	82,25
5	sem	1,0	40	3	90,1900	0,384318	88,54	91,84
5	sem	1,0	50	3	89,9567	0,432255	88,10	91,82
5	sem	1,0	60	3	87,9733	2,118571	78,86	97,09
5	sem	2,0	40	3	99,1900	1,732667	91,73	106,65
5	sem	2,0	50	3	99,3467	0,828700	95,78	102,91
5	sem	2,0	60	3	99,7733	0,066416	99,49	100,06
5	com	1,0	40	3	97,5367	0,893352	93,69	101,38
5	com	1,0	50	3	106,8267	1,340514	101,06	112,59
5	com	1,0	60	3	111,0500	0,493288	108,93	113,17
5	com	2,0	40	3	100,7967	0,589190	98,26	103,33
5	com	2,0	50	3	95,4333	0,689186	92,47	98,40
5	com	2,0	60	3	94,3800	0,522909	92,13	96,63

* IC = Intervalo de Confiança.

A análise do efeito da variável tempo sobre a resposta nos mostra uma tendência do aumento da variabilidade da resposta com o aumento do tempo (Tabela 4.27). Parece haver uma tendência de diminuição da média da resposta com o aumento do tempo. Aplicando o teste de tukey sobre as médias, percebe-se que, na média, o efeito da variável tempo quando este é de 40 minutos é maior que dos outros tempos e o intervalo de confiança deste tempo

não se confunde com nenhum dos outros tempos. Já os tempos de 50 e 60 minutos, tem em média, um efeito menor sobre a reposta, sendo que seus intervalos de confiança se confundem, a um nível de confiança de 5%.

A Tabela 4.28 apresenta o teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos da concentração de sorbitol. A análise do efeito da concentração de sorbitol sobre a reposta, mostra uma maior variabilidade de dados na concentração de 2,0 M. As médias de ambos são muito semelhantes, induzindo que a alteração do nível de sorbitol tem pouca ou nenhuma influência na análise dos intervalos de confiança mostra que estes dois grupos são homogêneos.

A análise dos níveis do fator tipo de agitação revela que a desvio padrão para o efeito com agitação é bastante superior ao efeito sem agitação. Além disso, suas médias são muito próximas, o que mostra não haver efeito significativo do fator agitação sobre a reposta. O teste de Tukey sobre as médias que afirma esta ideia é apresentado na Tabela 4.29. A análise da concentração de umectante revela que ambos os casos tem variabilidade semelhante e que, em média, as respostas são mais elevadas usando 5 g/L de umectante. O teste de tukey, apresentado na Tabela 4.30, mostra que os efeitos destes dois grupos não são coincidentes, que os grupos não são homogêneos.

Tabela 4.27. Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos do tempo utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Tempo (min)	Atividade remanescente (%)	1	2
40	97,36		****
50	95,01	****	
60	95,50	****	

Tabela 4.28. Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos da concentração de sorbitol utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Sorbitol (M)	Atividade remanescente (%)	1
1,0	95,87	****
2,0	96,04	****

Tabela 4.29. Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos do tipo de agitação utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Agitação	Atividade remanescente (%)	1
sem	95,72	****
com	96,19	****

Tabela 4.30. Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos do umectante utilizado sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Umectante (g/L)	Atividade remanescente (%)	1	2
3,0	94,20	****	
5,0	97,70		****

A seguir, são apresentados os gráficos de efeito de interação entre combinações quadrática, cúbica e quádrupla dos parâmetros. Na Figura 4.23 é apresentada a interação entre os parâmetros tipo de agitação e umectante. Nota-se que existe efeito sinérgico positivo entre esses dois parâmetros, pois ocorre uma mudança na inclinação das linhas.

A Figura 4.24 mostra a análise da interação entre o efeito umectante e tempo e que o efeito de interação é pequeno ou nenhum. Na Figura 4.25 é apresentada a análise de interação entre os efeitos da concentração de sorbitol e umectante. Nota-se que para essa combinação não existe interação entre os efeitos. Para os efeitos de concentração de sorbitol e tipo de agitação (Figura 4.26); tipo de agitação e tempo (Figura 4.27) e concentração de sorbitol e tempo (Figura 4.28) observa-se que existe interação entre esses efeitos.

Dentre as possibilidades de combinações entre três parâmetros para avaliar se existe interação tem-se na Figura 4.29 a interação entre os efeitos da concentração de sorbitol, tipo de agitação e umectante. Nota-se que em 1 M existe interação, pois ocorre a mudança de inclinação entre as linhas, enquanto a 2 M as linhas são praticamente paralelas, indicando que não existe efeito de interação.

A Figura 4.30 mostra a combinação entre os parâmetros: efeito umectante, tipo de agitação e tempo, sobre a atividade remanescente (%) em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. Observa-se que não existe interação entre os efeitos em 40 minutos, mas existe entre 50 e 60 minutos.

Os efeitos da concentração de sorbitol, umectante e tempo não apresentam interação (Figura 4.31) mas quando a concentração de sorbitol e tempo é combinado com o tipo de agitação (Figura 4.32), em 40 minutos não existe interação entre os efeitos, mas a 50 e 60 minutos é verificado efeito sinérgico positivo.

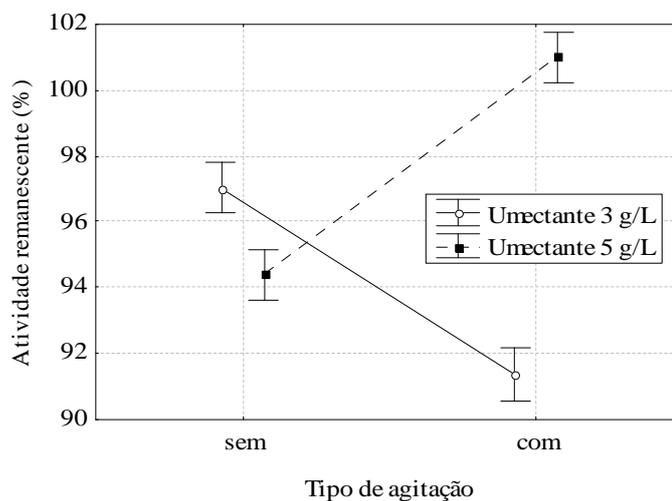


Figura 4.23. Análise da interação entre os efeitos do tipo de agitação e umectante sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. [F(1, 48) = 243,25, p = 0,0000]

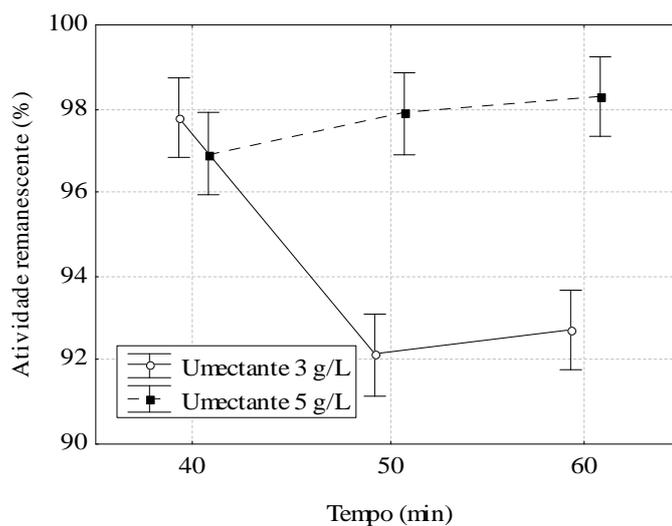


Figura 4.24. Análise da interação entre o efeito umectante e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. [F(2,48) = 30,729, p = 0,00000]

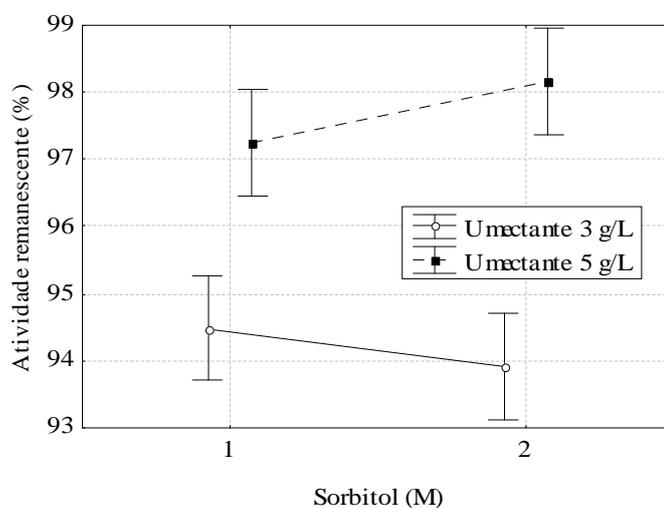


Figura 4.25. Análise da interação entre os efeitos da concentração de sorbitol e umectante sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. $[F(1,48) = 3,4568, p = 0,06913]$

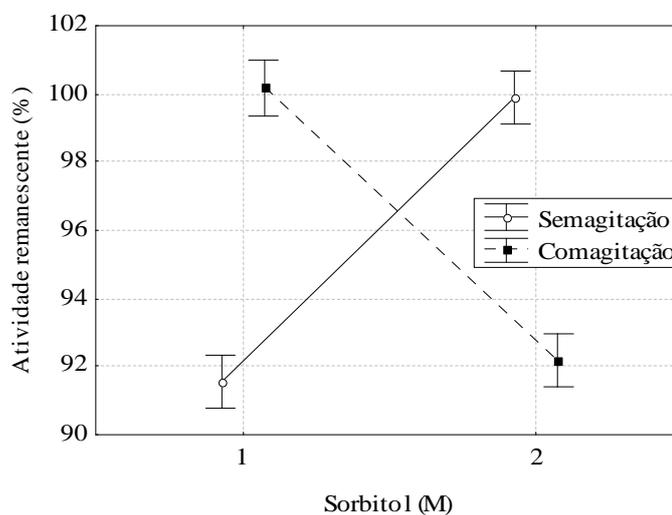


Figura 4.26. Análise da interação entre os efeitos da concentração de sorbitol e tipo de agitação sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. $[F(1,48) = 428,58, p = 0,0000]$

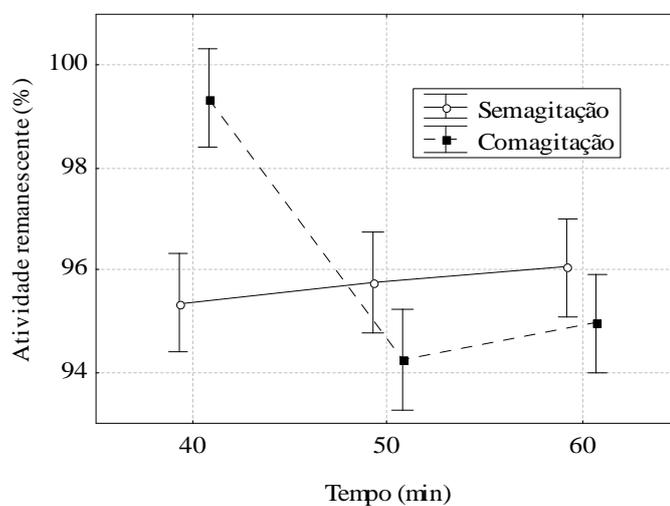


Figura 4.27. Análise da interação entre os efeitos do tipo de agitação e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. [F(2,48) = 20,344, p = 0,00000]

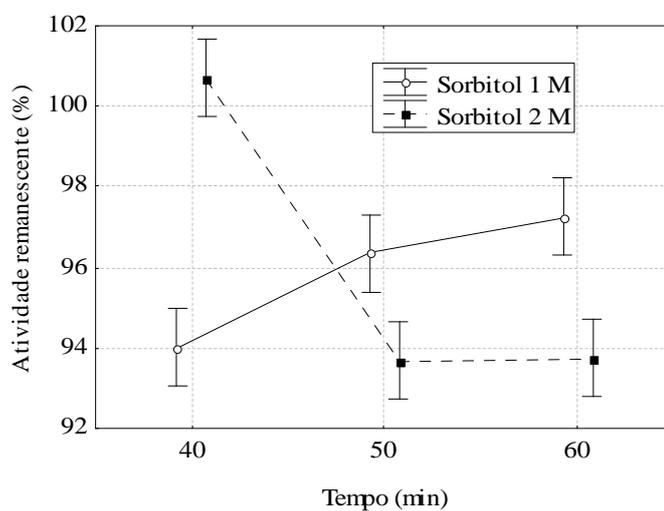


Figura 4.28. Análise da interação entre os efeitos da concentração de sorbitol e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. [F(2,48)=69,327, p = 0,00000]

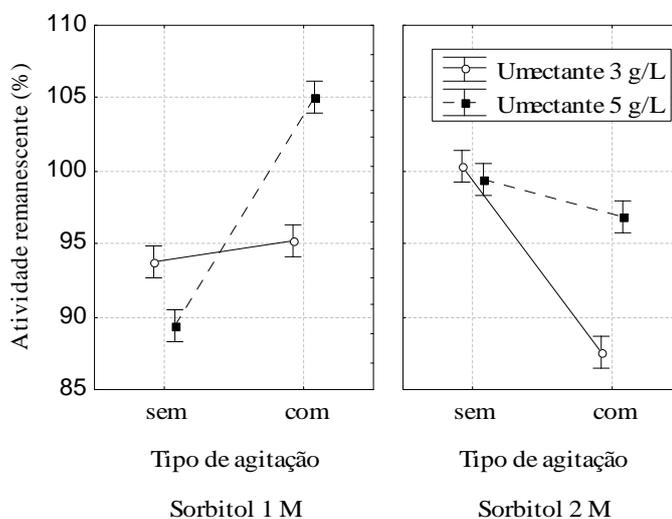


Figura 4.29. Análise da interação entre os efeitos da concentração de sorbitol, tipo de agitação e umectante sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. [F(1,48) = 6,8863, p = 0,01161]

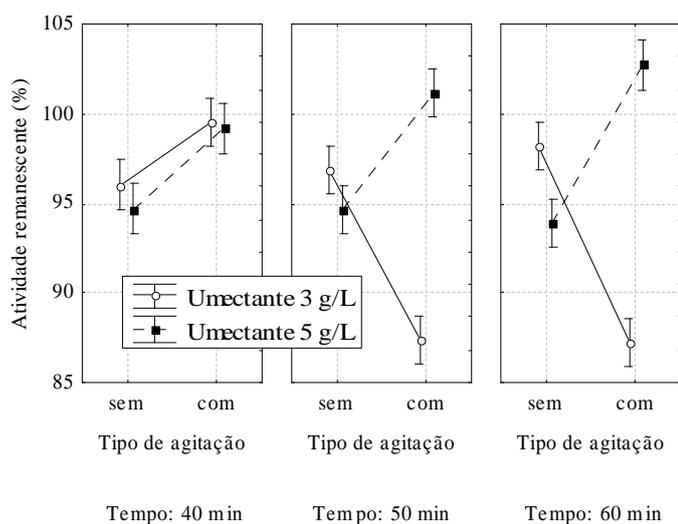


Figura 4.30. Análise da interação entre o efeito umectante, tipo de agitação e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. [F(2,48) = 53,875, p = 0,00000]

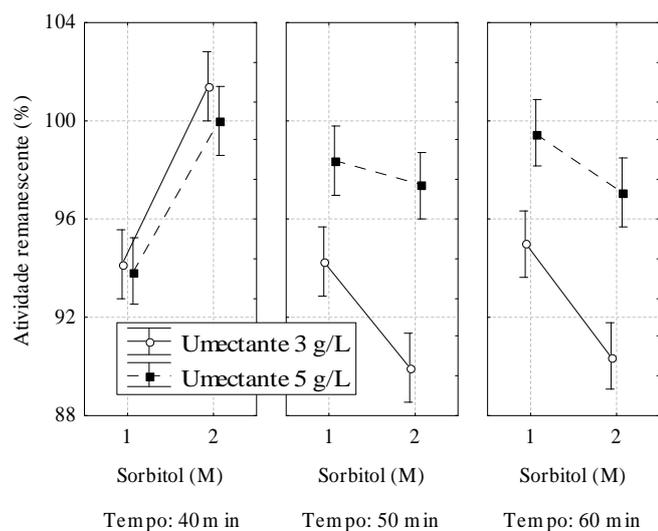


Figura 4.31. Análise da interação entre os efeitos da concentração de sorbitol, umectante e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. $[F(2,48) = 2,8823, p = 0,06574]$

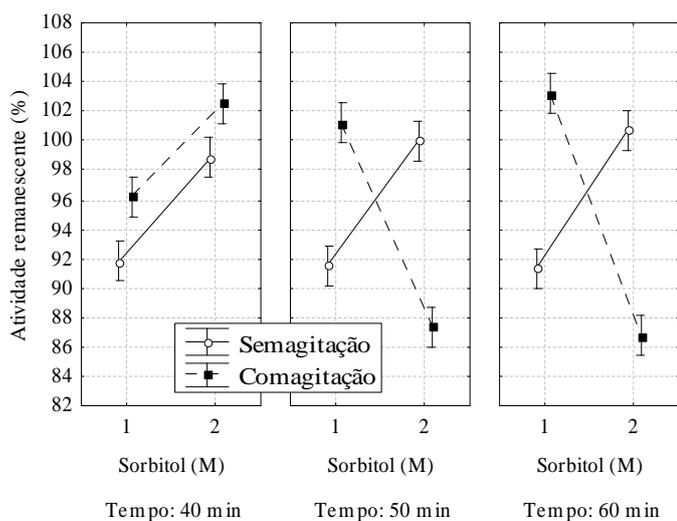


Figura 4.32. Análise da interação entre os efeitos da concentração de sorbitol, tipo de agitação e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. $[F(2,48) = 99,882, p = 0,0000]$

Na Figura 4.33 são mostrados os efeitos de interação entre todos os parâmetros. Observa-se que ocorre efeito sinérgico, para a concentração de sorbitol 1,0 M, pois ocorre a mudança de inclinação das linhas. Para a concentração de sorbitol 2,0 M, observa-se efeito sinérgico positivo quando o tempo de incubação varia entre 50 e 60 minutos.

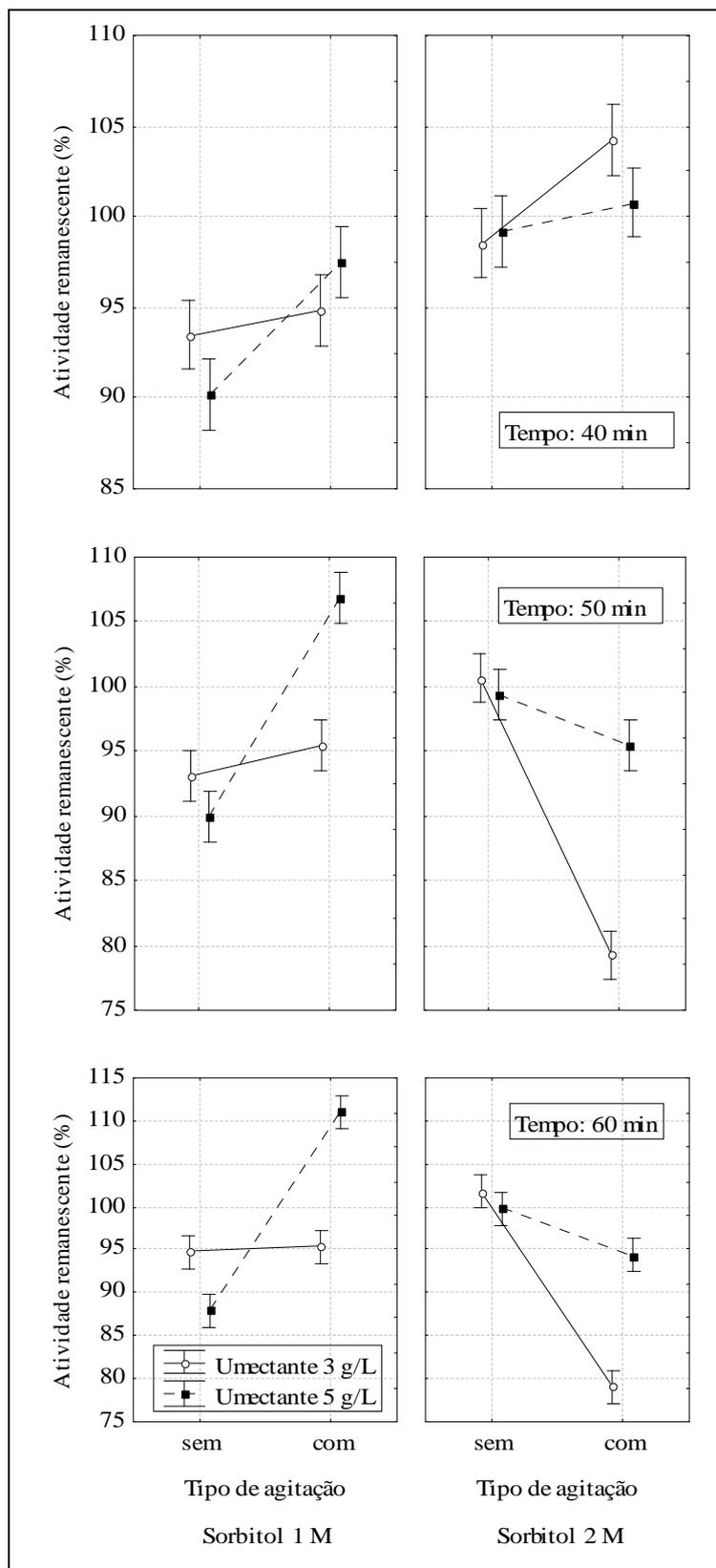


Figura 4.33. Análise da interação entre todos os efeitos sobre a atividade remanescente (%) do caldo centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

A análise da variância, apresentada na Tabela 4.31, mostra que os efeitos do fator tipo de agitação e dos níveis do fator concentração de sorbitol não foram significativos sobre o resultado. Como visto, anteriormente, nos gráficos de análise dos efeitos. A interação entre o efeito umectante x concentração de sorbitol e umectante e concentração de sorbitol e tempo também não foram significativos sobre a reposta. Os efeitos de maior magnitude sobre a reposta foram o umectante, umectante e agitação (enorme), umectante e concentração de sorbitol, concentração de sorbitol e tempo. O efeito da alteração dos níveis do fator concentração de sorbitol e agitação sobre a variável reposta não foi significativo. Também não foi significativa, a interação entre umectante e concentração de sorbitol e umectante e concentração de sorbitol e tempo.

Tabela 4.31. ANOVA da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado para combinação de todos os efeitos em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Efeito	GL	SQ	MQ	F	p
Constante	1	662922,39	662922,39	238541,62	0,00E-01
Umectante	1	220,50	220,50	79,34	9,71E-12
Agitação	1	3,99	3,99	1,43	2,37E-01
Sorbitol	1	0,50	0,50	0,18	6,72E-01
Tempo	2	73,64	36,82	13,25	2,62E-05
Umectante*Agitação	1	676,02	676,02	243,25	0,00E-01
Umectante*Sorbitol	1	9,61	9,61	3,46	6,91E-02
Agitação*Sorbitol	1	1191,05	1191,05	428,58	0,00E-01
Umectante*Tempo	2	170,80	85,40	30,73	2,56E-09
Agitação*Tempo	2	113,07	56,54	20,34	3,99E-07
Sorbitol*Tempo	2	385,33	192,66	69,33	6,99E-15
Umectante*Agitação*Sorbitol	1	19,14	19,14	6,89	1,16E-02
Umectante*Agitação*Tempo	2	299,44	149,72	53,87	5,39E-13
Umectante*Sorbitol*Tempo	2	16,02	8,01	2,88	6,57E-02
Agitação*Sorbitol*Tempo	2	555,16	277,58	99,88	0,00E-01
Umectante*Agitação*Sorbitol*Tempo	2	33,04	16,52	5,94	4,94E-03
Erro/Resíduos	48	133,40	2,78		
Total	71	3900,68			

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

Quanto maior for a fração descrita pela regressão, significa que melhor será o ajuste do modelo. Assim, se o coeficiente de determinação (R^2) foi calculado como:

$$R^2 = \frac{SS_{\text{modelo}}}{SS_{\text{total}}} = \frac{3.767,28}{3.900,68} = 0,9658. \text{ onde } SS_{\text{erro}} = SS_{\text{total}} - SS_{\text{modelo}} \rightarrow SS_{\text{modelo}} = 3900,68 - 133,40 = 3767,28.$$

Devido ao fato de que o R^2 sempre aumenta à medida que se adicionam termos ao modelo, o uso do R^2 ajustado é preferível, pois em geral, este nem sempre vai aumentar com o acréscimo de termos no modelo. De fato, se termos desnecessários são adicionados ao modelo o valor de R^2 ajustado frequentemente diminui. Quando o R^2 e o R^2 ajustado são muito diferentes, existe a possibilidade de que termos não significativos tenham sido adicionados ao modelo. O R^2 ajustado foi calculado pela fórmula (4.1).

$$R^2_{\text{ajustado}} = 1 - \frac{\left(\frac{SS_{\text{erro}}}{n - p} \right)}{\left(\frac{SS_{\text{total}}}{n - 1} \right)} \quad (4.1)$$

Assim, $R^2_{\text{ajustado}} = 0,94941$.

A Tabela 4.32 mostra o R^2 ajustado do modelo obtido considerando-se todos os efeitos acima, mesmo os que não são significativos. Esta não é uma regressão propriamente dita, com base num modelo de superfície de resposta. É apenas uma análise da variabilidade dos dados que pode ser explicada com base nos efeitos significativos da ANOVA. Assim todos os efeitos apresentados na ANOVA, cerca de 95% dos dados puderam ser explicados por eles e suas interações.

Os valores do R^2 múltiplo e R^2 ajustado são elevados. Essa alta correlação da variável dependente com as variáveis independentes indicam que o modelo ajustado explica bem a variabilidade do valor da atividade remanescente. Portanto 94,94% da variação na atividade remanescente pode ser explicada através das variações nas variáveis e 5,06% da atividade remanescente são explicados por outras variáveis que não constam no modelo.

Para verificação da preposição da normalidade dos resíduos calculou-se R^2 ajustado. Esse explica 93,80% da variabilidade dos dados, evidenciando que o modelo proposto é adequado para os dados.

Retirando-se os efeitos não significativos do modelo e adicionado-se os valores dos seus SQ ao $SQ_{\text{erro puro}}$, o valor do $SQ_{\text{erro puro}}$ foi 163,52 ($133,40+16,02+9,61+0,50+3,99 = 163,52$). Com este valor, foi recalculado o valor do R^2 (0,9581) e R^2 ajustado (0,9380) o que é um valor razoável, pois cerca de 94% de variabilidade foi explicada em função dos efeitos

significativos (Tabela 4.33). Assim, o modelo com base nos efeitos significativos e suas interações foi significativo. Não foi possível calcular a falta de ajuste do modelo, pois a ANOVA, usou todos os graus de liberdade disponíveis para calcular os efeitos significantes. Na Figura 4.34 são apresentados os resíduos deixados pelo modelo. Observa-se que os resíduos flutuam aleatoriamente em torno do zero, implicando que a variância dos erros é constante e a média é igual a zero.

Aplicando o teste de Tukey para comparar médias, foi obtida a Tabela 4.34. Embora este teste seja mais usado para a ANOVA unifatorial na comparação de médias, também pode ser usado como um método adicional que permite observar os máximos e mínimos obtidos neste planejamento.

Observa-se que as menores médias foram obtidas com 3 g/L de umectante, com agitação, com 2,0 M de sorbitol e tempo 50 e/ou 60 minutos, embora pela análise do intervalo de confiança destas médias, não seja possível afirmar que as os resultados destas duas médias foram diferentes para estes dois tempos.

Tabela 4.32. Teste de significância do modelo para atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Variável Dependente	AR (%)	Variável Dependente	AR (%)
R múltiplo	0,982752	SQ residual	133,3951
R^2 múltiplo	0,965802	GL residual	48
R^2 ajustado	0,949416	MQ residual	2,779064
Modelo SQ	3767,289	F	58,93897
Modelo GL	23	p	0,00E-01
Modelo MQ	163,7952		

* AR = Atividade Remanescente; GL = Graus de Liberdade, SQ = Soma Quadrática, MQ = Média Quadrática.

Tabela 4.33. Teste de significância do modelo da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, após retirada dos efeitos não significativos.

Variável Dependente	AR (%)	Variável Dependente	AR (%)
Modelo SQ	3.767,289	Erro puro SQ	133,3951
Modelo GL	23	Erro puro GL	48
Modelo MQ	163,7952	Erro puro MQ	2,779064
F	58,93897	p	0,00E-01

* AR = Atividade Remanescente.

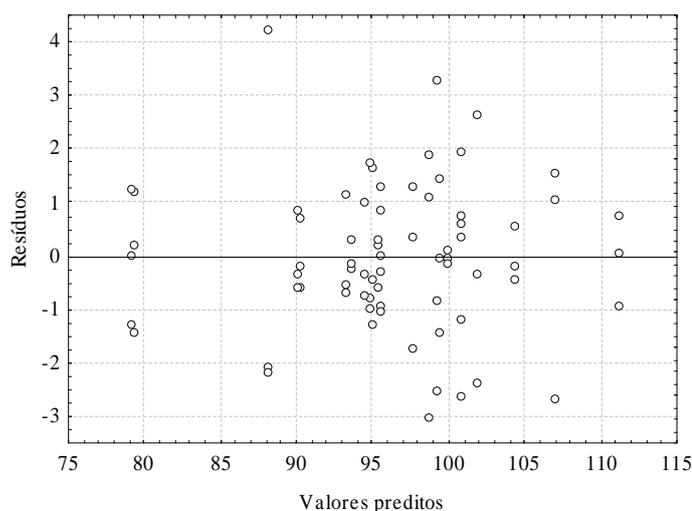


Figura 4.34. Resíduos em função dos valores preditos dos efeitos umectante, tipo de agitação, concentração de sorbitol e tempo sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Por outro lado, tem-se a maior reposta com 5 g/L de umectante, com agitação, 1 M de sorbitol, nos tempos de 50 e/ou 60 minutos. Devido ao alto desvio padrão apresentado no tempo de 60 minutos (ver análise do efeito da temperatura) não é possível afirmar exatamente que o tempo de 60 minutos apresenta uma reposta significativamente maior que no tempo de 50 minutos, embora os dados nos mostrem esta tendência.

Nota-se que neste caso não foi feita uma superfície de resposta, e, portanto não é possível obter informações sobre características quadráticas do efeito do tempo sobre a resposta, e nem realizar extrapolações e conclusões sobre onde estaria o máximo ou o mínimo da resposta usando níveis internos dos fatores que não estão presentes no planejamento experimental. Desta forma, a função desejabilidade está limitada aos níveis dos fatores do planejamento. Fazendo uma análise da função desejabilidade da resposta, com base nos efeitos apresentados pela análise de variância, obtém-se a Figura 4.35.

Da análise da função de desejabilidade, percebe-se que se obtém um máximo na atividade remanescente, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, de cerca de 111% usando os níveis 5 de umectante, com agitação, 1,0 M de sorbitol e um tempo de 60 minutos. Fazendo uma corrida com estes níveis e verificando se a reposta obtida experimentalmente aproxima-se do valor esperado de 111% seria o ideal para se ter uma comprovação da validade dessa análise. Mas como visto no teste de tukey, o efeito dos níveis do tempo de 50 e 60 minutos são muito semelhantes, e a reposta ótima poderia ser obtida no tempo de 50

minutos. Isso poderia ser elucidado se o desvio padrão no tempo de 60 minutos não fosse o maior de todos.

Tabela 4.34. Teste de Tukey aplicado à análise dos grupos homogêneos de todos os parâmetros utilizados sobre a atividade remanescente, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Umectante (g/L)	Tipo de agitação	Sorbitol (M)	Tempo (min)	AR (%)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
3	com	2	60	79,10	****												
3	com	2	50	79,26	****												
5	sem	1	60	87,97		****											
5	sem	1	50	89,96		****	****										
5	sem	1	40	90,19		****	****	****									
3	sem	1	50	93,08		****	****	****	****								
3	sem	1	40	93,48			****	****	****	****							
5	com	2	60	94,38			****	****	****	****	****						
3	sem	1	60	94,73			****	****	****	****	****	****					
3	com	1	40	94,84			****	****	****	****	****	****					
3	com	1	60	95,30				****	****	****	****	****					
5	com	2	50	95,43				****	****	****	****	****	****				
3	com	1	50	95,49					****	****	****	****	****				
5	com	1	40	97,54					****	****	****	****	****	****			
3	sem	2	40	98,55						****	****	****	****	****			
5	sem	2	40	99,19							****	****	****	****	****		
5	sem	2	50	99,35							****	****	****	****	****		
5	sem	2	60	99,77								****	****	****	****		
3	sem	2	50	100,66									****	****	****		
5	com	2	40	100,80										****	****		
3	sem	2	60	101,70											****	****	****
3	com	2	40	104,27												****	****
5	com	1	50	106,83													****
5	com	1	60	111,05													****

*AR = Atividade Remanescente.

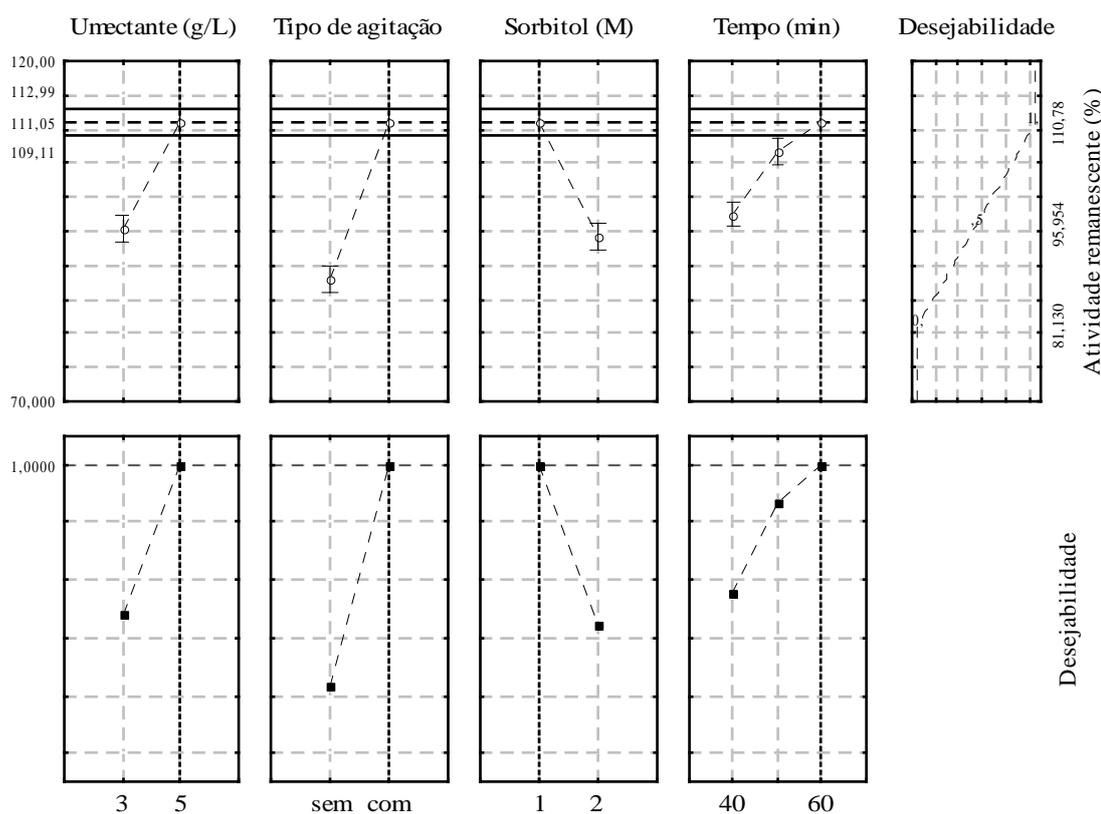


Figura 4.35. Perfil para os valores preditos e desejabilidade da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado para todos os efeitos em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

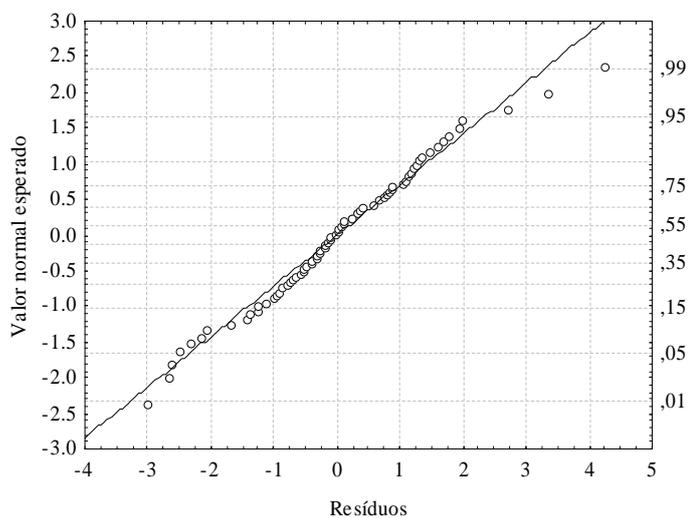
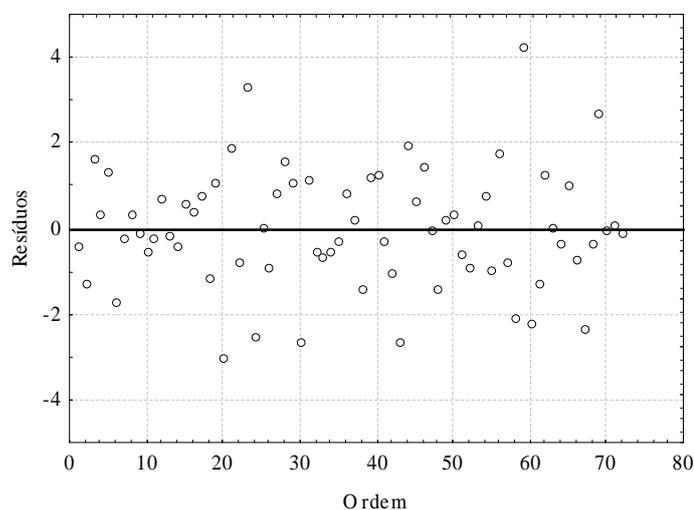
O teste de Levene (Tabela 4.35) não mostrou bons resultados quanto à homogeneidade de variância dos dados. A análise das médias e desvio padrão, segundo o diagrama de dispersão da Figura 4.20, mostra um alto desvio padrão para uma média de 87,97 com 3,67 de desvio padrão e esse foi o principal fator para o teste de Levene ter mostrado a falta de homogeneidade de variâncias, já que não há visualmente indícios de uma correlação linear entre médias e desvio padrão. Desta forma, como não há fortes indícios sobre a violação desta hipótese, não há razão para não se aplicar à estatística F do teste de análise de variância.

A Figura 4.36 mostra que a suposição de normalidade dos resíduos é satisfeita.

A Figura 4.37 apresenta os valores residuais da combinação de todos os fatores em função da ordem em que foram realizados. Observa-se uma disposição dos erros de forma aleatória, que conforme explicado anteriormente, garante a independência dos erros.

Tabela 4.35. Teste de Levene para homogeneidade de variâncias.

Média quadrática efeito	Média quadrática erro	F	p
1,416847	0,477469	2,967411	7,3754E-04

**Figura 4.36.** Gráfico da probabilidade normal esperada dos resíduos para o modelo da atividade remanescente (%) em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.**Figura 4.37.** Resíduos em função da ordem do umectante, tipo de agitação, concentração de sorbitol e tempo sobre a atividade remanescente (%) em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

4.6. EFEITO DE AGENTES QUÍMICOS

A influência dos agentes químicos (íons) sobre a atividade remanescente, em solução glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, do caldo bruto da xilanase de *B. pumilus* CBMAI 0008, na concentração final de 5mM, é apresentada na Tabela 4.36. As médias, intervalo de confiança, erro e desvio padrão foram calculados pelo pacote STATISTICA 7. Observa-se que os íons K^+ , Na^+ e NH_4^+ promovem um leve aumento na atividade para os íons e os íons Ca^{2+} , Mn^{2+} e EDTA promovem inibição moderada, de aproximadamente 25-35%, enquanto o Mg^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} a uma inibição bastante expressiva, reduzindo a atividade para menos de 30%. É justificado na literatura que os cátions interagem com os resíduos de aminoácidos dos sítios ativos da enzima, aumentando (modulação positiva) ou diminuindo (modulação negativa) a atividade enzimática (Damaso *et al.*, 2002). Nota-se que alguns dos efeitos, inibitórios (Ca^{2+} , Mg^{2+} e Zn^{2+}) e ativadores (Na^+), observados sobre a atividade do caldo bruto da xilanase de *B. pumilus* CBMAI 0008 também foram observados em mesma ordem de grandeza para xilanase de *T. lanuginosus* IOC-4145, na concentração final de 5mM (LE MOS *et al.*, 2000).

Tabela 4.36. Estatística descritiva da influência dos aditivos sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Fatores	N	ARM	Desvio padrão	Erro	-95,00%	+95,00%
Total	27	64,4233	41,56593	7,999368	47,9804	80,8663
CaCl ₂	3	73,7533	0,44523	0,257056	72,6473	74,8594
MnSO ₄	3	69,2100	0,23065	0,133167	68,6370	69,7830
MgSO ₄	3	26,9100	1,79669	1,037320	22,4468	31,3732
ZnSO ₄	3	12,3667	0,28746	0,165965	11,6526	13,0808
CuSO ₄	3	2,4033	0,30616	0,176761	1,6428	3,1639
KCl	3	101,4333	2,49885	1,442710	95,2259	107,6408
NaCl	3	104,7400	2,63046	1,518695	98,2056	111,2744
(NH ₄) ₂ SO ₄	3	126,7733	0,97623	0,563629	124,3482	129,1984
EDTA	3	62,2200	0,98423	0,568243	59,7750	64,6650

* ARM = Atividade Remanescente Média.

4.7. EFEITO DOS AGENTES TENSOATIVOS

O planejamento 3^3 realizado para avaliar o efeito dos agentes tensoativos e tempo de processo sobre a atividade enzimática remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH, pH 9,0, é apresentado na Tabela 4.37 e na Tabela 4.38, a estatística descritiva.

Tabela 4.37. Resposta do planejamento experimental 3^3 utilizado para avaliar a influência dos agentes tensoativos sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Ensaio	Tempo (min)	Emulsificante (g/L)	Umectante (g/L)	AR (%)
1	60	1,0	1,0	24,07
2	60	1,0	5,0	36,71
3	60	2,0	5,0	45,91
4	30	1,0	1,0	55,01
5	30	1,0	5,0	58,86
6	60	2,0	5,0	33,74
7	30	2,0	1,0	51,07
8	30	2,0	1,0	51,78
9	60	2,0	5,0	33,74
10	45	1,5	3,0	56,13
11	30	1,0	5,0	56,91
12	30	2,0	5,0	54,56
13	45	1,5	3,0	55,07
14	45	1,5	3,0	57,27
15	60	2,0	1,0	24,88
16	60	1,0	1,0	33,52
17	30	1,0	1,0	65,34
18	30	2,0	5,0	56,99
19	30	2,0	5,0	57,46
20	30	1,0	5,0	61,76
21	60	2,0	1,0	14,56
22	30	1,0	1,0	47,15
23	30	2,0	1,0	51,07
24	60	1,0	5,0	31,76
25	60	1,0	5,0	25,68
26	60	1,0	1,0	17,37
27	60	2,0	1,0	24,17

* AR = Atividade Remanescente.

A ideia na análise da influência dos tensoativos, emulsificante e umectante, sobre a atividade, se deve à avaliação da influência da composição desses agentes na atividade, mais especificamente o umectante. O umectante contém em sua composição álcoois alifáticos e esses poderiam ter efeito protetivo e, portanto estabilizante semelhante ao dos polióis para as enzimas utilizadas, principalmente o caldo bruto centrifugado.

Tabela 4.38. Estatística descritiva da influência dos agentes tensoativos sobre a atividade remanescente (%) em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, para o caldo bruto centrifugado.

Tempo (min)	N	Emulsificante (g/L)	Umectante (g/L)	Média	Desvio Padrão	IC -95,00%	IC +95,00%
30	3	1,0	1,0	55,83333	9,12291	33,17	78,50
30	3	1,0	5,0	59,17667	2,44046	53,11	65,24
30	3	2,0	1,0	51,30667	0,40992	50,29	52,32
30	3	2,0	5,0	56,33667	1,55648	52,47	60,20
45	3	1,5	3,0	56,15667	1,10024	53,42	58,89
60	3	1,0	1,0	27,73333	5,07021	15,14	40,33
60	3	1,0	5,0	31,38333	5,52464	17,66	45,11
60	3	2,0	1,0	21,20333	5,76424	6,88	35,52
60	3	2,0	5,0	38,48667	6,51158	22,31	54,66
	27			44,17963	14,59925	38,40	49,95

* IC = Intervalo de Confiança.

Na ANOVA do projeto fatorial, houve falta de ajuste do modelo linear simples, sem combinações e com combinações lineares. Por isso, testou-se um modelo quadrático dos efeitos principais e combinações lineares, que não apresentou mais a falta de ajuste do modelo. A Tabela 4.39 mostra que as combinações lineares não foram significativas. Os efeitos quadráticos dos agentes tensoativos, emulsificante e umectante, mostraram-se combinações lineares de outros efeitos e não foram computados. Na ANOVA do modelo quadrático e linear apenas com efeitos principais não houve falta de ajuste. Eliminando os efeitos de combinações lineares e o efeito quadrático de umectante e emulsificante e o efeito linear do emulsificante, que não foram significativos, tem-se a Tabela 4.40. A ANOVA

apresenta a estatística “*lack-of-fit*”. Essa foi usada para testar a adequação e eficiência do modelo obtido. Infelizmente o coeficiente de determinação (R^2) não mostrou alta concordância (0,85898), devido à dificuldade de representar a interação entre os fatores, principalmente o decréscimo de atividade com o aumento do tempo e concentração de umectante. O “*lack-of-fit*” não é significativo, pois o valor de p de 0,138 excede o valor limite (0,05).

Tabela 4.39. ANOVA da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em função dos agentes tensoativos em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Parâmetro	SQ	GL	MQ	F	p
(1) Tempo (min) (L)	4044,049	1	4044,049	161,8769	1,96E-10
Tempo (min) (Q)	484,142	1	484,142	19,3794	3,44E-04
(2) Emulsificante (g/L) (L)	17,306	1	17,306	0,6927	4,16E-01
(3) Umectante (g/L) (L)	322,080	1	322,080	12,8924	2,09E-03
1L by 2L	23,641	1	23,641	0,9463	3,44E-01
1L by 3L	59,158	1	59,158	2,3680	1,41E-01
2L by 3L	88,013	1	88,013	3,5230	7,68E-02
Lack of Fit	53,521	1	53,521	2,1424	1,61E-01
Erro puro	449,680	18	24,982		
Total SS	5.541,591	26			

* SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática; R -sqr = 0,9092; R^2 ajustado = 0,8757.

Os coeficientes estimados para o modelo significativo são mostrados na Tabela 4.41 e Tabela 4.42. Na Tabela 4.42 o primeiro termo, constante, se refere ao intercepto. Também se observa que o efeito do tempo na atividade remanescente é quadrático e que têm grande efeito no modelo. O tempo também apresenta influência de não-linearidade do modelo com o umectante. Com base na magnitude dos efeitos (Tabela 4.41), pode-se notar que o tempo tende a diminuir a atividade enquanto o umectante tende a elevar suavemente a atividade. Não foi observada anormalidade no gráfico de normalidade de erros (Figura 4.40) e dos resíduos (Figura 4.41) indicando que o modelo é consistente.

Tabela 4.40. ANOVA da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em função dos agentes tensoativos em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, após excluir os termos não significantes.

Parâmetro	SQ	GL	MQ	F	p
(1) Tempo (min) (L)	4.044,049	1	4.044,049	161,8769	1,96E-10
Tempo (min) (Q)	484,142	1	484,142	19,3794	3,44E-04
(3) Umectante (g/L) (L)	322,080	1	322,080	12,8924	2,09E-03
Lack of Fit	241,639	5	48,328	1,9345	1,38E-01
Erro puro	449,680	18	24,982		
Total SS	5.541,591	26			

* SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática; R-sqr = 0,8753; R² ajustado = 0,8590.

Tabela 4.41. Coeficientes estimados no modelo empírico para atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, depois da exclusão dos termos não significantes.

Parâmetro	Efeito	Erro padrão Erro puro	t(18)	p	IC -95,00%	IC +95,00%
Constante	56,16	2,89	19,46	1,54E-13	50,09	62,22
(1) Tempo (min)(L)	-25,96	2,04	-12,72	1,96E-10	-30,25	-21,67
Tempo (min)(Q)	-26,95	6,12	-4,40	3,44E-04	-39,81	-14,09
(3) Umectante (g/L)(L)	7,33	2,04	3,59	2,09E-03	3,04	11,61

* IC = Intervalo de Confiança; R-sqr = 0,8753; R² ajustado = 0,8590.

Tabela 4.42. Coeficientes estimados no modelo de regressão para atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, depois da exclusão dos termos não significantes.

Parâmetro	Coefficiente de regressão	Erro padrão Erro puro	t(18)	p	IC -95,00%	IC +95,00%
Constante	-31,66	25,07947	-1,26252	0,222874	-84,35	21,027
(1) Tempo (min)(L)	4,52	1,22620	3,68968	0,001677	1,95	7,100
(3) Umectante (g/L)(L)	1,83	0,51013	3,59059	0,002090	0,76	2,903
Tempo (min)(Q)	-0,06	0,01360	-4,40221	0,000344	-0,09	-0,031

* IC = Intervalo de Confiança; R-sqr = 0,8753; R² ajustado = 0,8590.

A Metodologia da Superfície de Resposta (MRS) foi utilizada para otimizar as condições de manter a atividade enzimática do caldo bruto estabilizado elevada. Os resultados experimentais analisados pela MRS geraram um modelo empírico, quadrático, para a melhor resposta (equação 4.2), onde x_1 = tempo (minuto) e x_2 = umectante (g/L). E com base nos valores reais das variáveis obtém-se a equação 4.3.

$$\text{Atividade remanescente (\%)} = 56,16 - 12,98 x_1 - 13,47 x_1^2 + 3,66 x_2 \quad (4.2)$$

$$\text{Atividade remanescente (\%)} = -31,66 + 4,52 \text{ tempo} - 0,06 \text{ tempo}^2 + 1,83 \text{ umec tan te} \quad (4.3)$$

A superfície de resposta e as curvas de nível para a superfície de resposta gerada pelo modelo obtido são apresentadas na Figura 4.38.

A Tabela 4.43 apresenta a resposta predita máxima de cada efeito no modelo proposto e Tabela 4.44 apresenta a influência dos fatores sob a atividade remanescente a partir das respostas preditas para cada nível de fator, mantendo-se os outros fatores constantes. Observa-se que o tempo apresenta atividade máxima a 37,5 minutos, sendo a atividade em tempos anteriores ou posteriores a esse, menores. Nota-se que o emulsificante independente da concentração testada não influencia a atividade, enquanto o umectante à medida que sua concentração sofre incremento a atividade também aumenta. O que induz supor que a premissa de sua composição com álcoois alifáticos influencia a estabilidade enzimática, e, portanto sua atividade remanescente. Com base nos dados pode-se afirmar que as condições ideais, para atividade remanescente máxima (62,94%) ocorrem com 37,5 minutos de incubação, com 1 g/L de agente emulsificante e 5 g/L de agente umectante.

Tabela 4.43. Resposta predita de cada efeito no modelo para atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Tempo (min)	Emulsificante (g/L)	Umectante (g/L)	Valor desejável	Valor predito	IC -95,00%	IC +95,00%
37,5	2,00	5,00	0,8992	62,9419	57,7741	68,1096

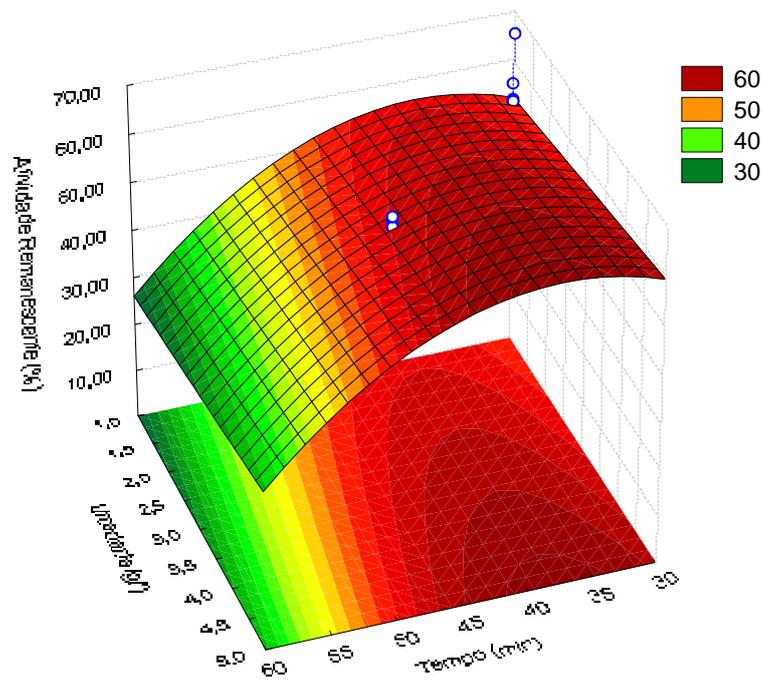
* IC = Intervalo de Confiança.

Como os fatores tempo e concentração umectante apresentam efeito sobre a atividade, na Tabela 4.45 são apresentados os valores preditos para a atividade remanescente considerando esses dois fatores.

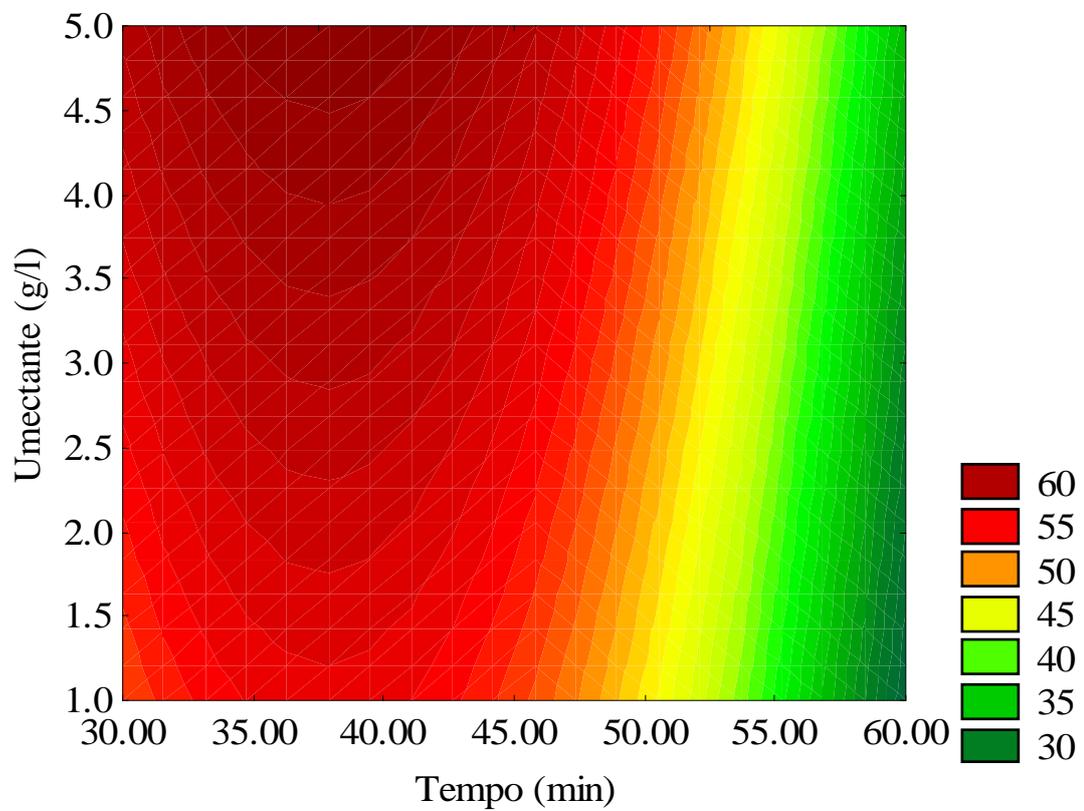
O gráfico de Pareto (Figura 4.42) mostra os valores do teste “t student” para cada parâmetro que demonstrou afetar a atividade remanescente (%). A linha tracejada indica a magnitude da significância estatística dos efeitos com um nível de significância de 95%. O gráfico mostra que somente o umectante apresenta efeito significativo na atividade enzimática.

Tabela 4.44. Respostas preditas para cada nível de cada fator mantendo todos os outros fatores constante.

Fator	Nível do fator	Valor desejável	Valor predito	IC -95,00%	IC +95,00%
Tempo (min)	30,0	0,847524	59,327	55,614	63,039
	37,5	0,899170	62,942	57,774	68,110
	45,0	0,854571	59,820	53,390	66,250
	52,5	0,713729	49,961	44,793	55,129
	60,0	0,476643	33,365	29,652	37,078
Emulsificante (g/L)	1,0	0,899170	62,942	57,774	68,110
	1,3	0,899170	62,942	57,774	68,110
	1,5	0,899170	62,942	57,774	68,110
	1,8	0,899170	62,942	57,774	68,110
	2,0	0,899170	62,942	57,774	68,110
Umectante (g/L)	1,0	0,794503	55,615	50,447	60,783
	2,0	0,820670	57,447	52,624	62,270
	3,0	0,846836	59,279	54,576	63,981
	4,0	0,873003	61,110	56,287	65,933
	5,0	0,899170	62,942	57,774	68,110



(a)



(b)

Figura 4.38. (a) Superfície de resposta que mostra o efeito das diferentes concentrações de umectante e tempo na atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado. (b) Curva de nível para a superfície do item (a).

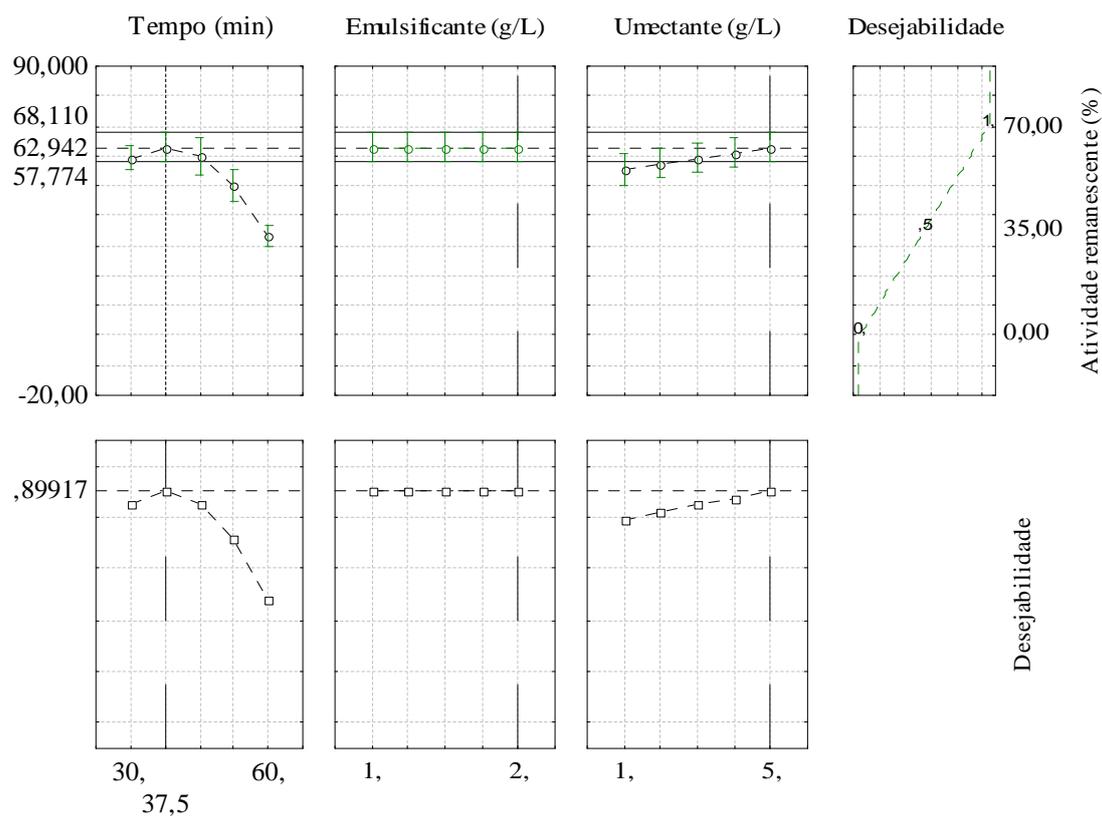


Figura 4.39. Perfil para os valores preditos e deseabilidade da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado para os agentes tensoativos.

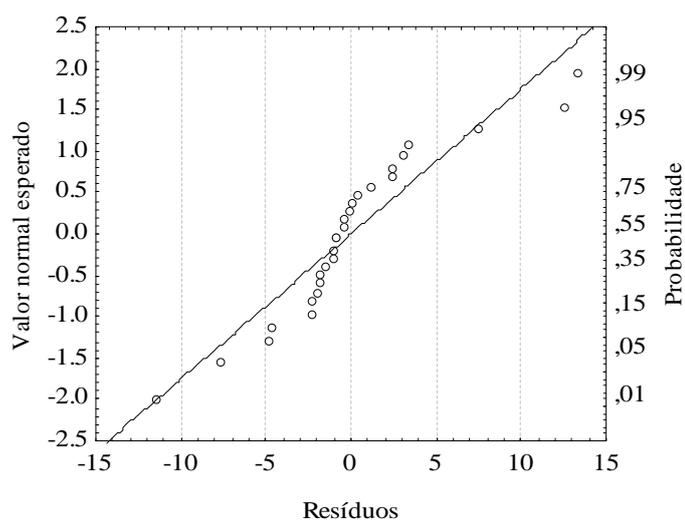


Figura 4.40. Gráfico de normalidade dos erros, da atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, em função dos agentes tensoativos.

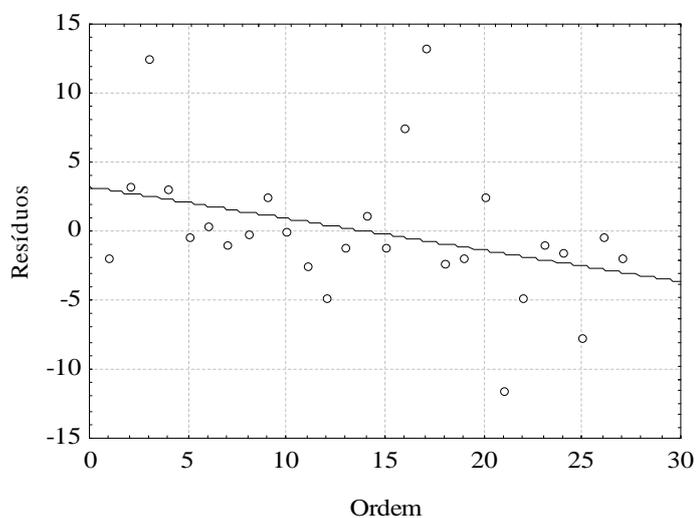


Figura 4.41. Resíduos em função da ordem para a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, para os agentes tensoativos.

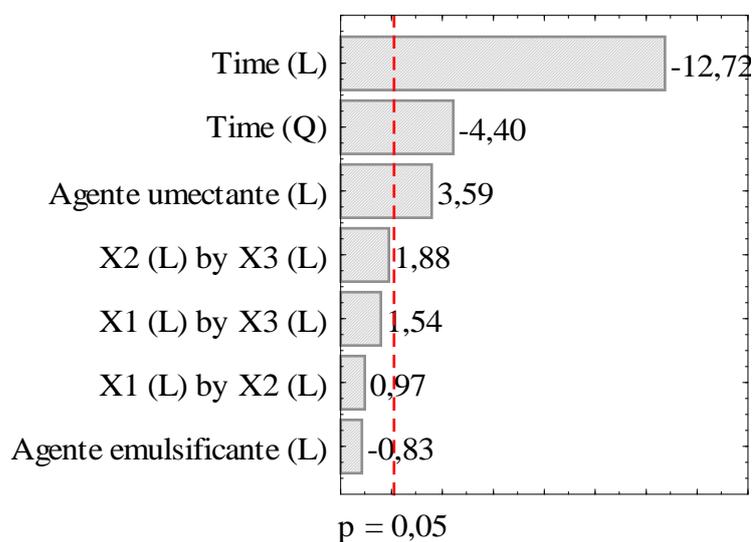


Figura 4.42. Gráfico de Pareto dos efeitos estimado (valor absoluto) sobre a atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado.

Tabela 4.45. Valores preditos para a atividade remanescente (%).

Fator	CR	Valor	VR									
Constante	-31,6633			-31,6633			-31,6633			-31,6633		
(1) Tempo (min)(L)	4,5243	37,500	169,6604	4,5243	37,500	169,6604	4,5243	37,500	169,6604	4,5243	37,500	169,6604
Tempo (min)(Q)	-0,0599	1406,250	-84,2135	-0,0599	1406,250	-84,2135	-0,0599	1406,250	-84,2135	-0,0599	1406,250	-84,2135
(3)Umectante (g/L)(L)	1,8317	3,000	5,4950	1,8317	3,500	6,4108	1,8317	4,000	7,3267	1,8317	4,500	8,2425
Predito			60,1944			60,1944			61,1102			62,0260
-95,00% Confiança			59,2785			55,4617			56,2874			57,0566
+95,00% Confiança			54,5763			64,9271			65,9330			66,9955
-95,00% Predito			47,7729			48,6763			49,5548			50,4086
-95,00% Predito			70,7842			71,7125			72,6656			73,6434

CR = Coeficiente de Regressão, VC = Valor do Coeficiente, R-sqr = 0,87525; R² ajustado = 0,85898, 3 fatores, 1 bloco, 27 corridas, Média Quadrática Erro Puro = 24,98224.

4.8. EFEITO DO CARBONATO-BICARBONATO USADO COMO TAMPÃO

A estabilização da xilanase de *B. pumilus* CBMAI 0008, tem por finalidade possibilitar a sua aplicação no processo de biopurga de tecidos em malha 100%. Nos testes realizados em laboratório, é utilizado solução tampão glicina-NaOH, entretanto para sua aplicação industrial esse tipo de correção de pH deve ser realizado com produtos que confirmam alcalinidade, como carbonato de sódio, ou hidróxido de sódio, por isso são apresentados na Tabela 4.46 o comportamento da atividade do caldo bruto centrifugado utilizando uma mistura de carbonato-bicarbonato de sódio 100 mM, que conferisse pH 9,0. Observa-se que a atividade, independente da temperatura, apresenta uma forte inibição da atividade com o uso deste produto para a correção do pH (9,0).

Tabela 4.46. Efeito do carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,0, sobre a atividade enzimática do caldo bruto centrifugado.

Temperatura (°C)	Ae (U/mL)	Temperatura (°C)	Ae (U/mL)
40	22,46	60	7,28
45	23,72	70	2,29
50	21,06	80	1,27
55	12,19	90	1,38

*Ae = Atividade enzimática, média, em solução tampão glicina-NaOH a 50°C, 120 U.

4.9. ENSAIOS DE BIOPURGA EM MALHA COM XILANASE

Os resultados apresentados, a seguir, são dos ensaios preliminares, antes do estudo de estabilização do caldo bruto e dos ensaios com o caldo bruto após determinadas as condições de estabilidade, para avaliar se ocorreu alguma alteração significativa nos resultados obtidos.

4.9.1. Ensaios Preliminares – Caldo Bruto sem Estabilização

Para avaliar o desempenho do caldo bruto centrifugado no substrato têxtil, tecido de malha 100% algodão cru, foi realizado ensaio de biopurga nas temperaturas de 50°C e 60°C,

variando-se o tipo de biopurga empregado: com preparação e *all in*, conforme descrito na seção 3.5.1. Também foi testado o efeito dos auxiliares químicos e da solução tampão para avaliar a efetividade da enzima. A preparação enzimática Pulpzyme HC também foi submetida à biopurga com preparação e *all in*, conforme descrito na seção 3.6.1, para a temperatura 50°C.

Com o objetivo de avaliar o efeito da biopurga na malha, bem como comparar com o processo convencional de purga (alcalina), testes de hidrofiliidade, grau de alvura e perda de massa foram realizados.

Na Tabela 4.47 é apresentada a média de hidrofiliidade para os tipos de purga estudados e do algodão cru. Observa-se que tanto a malha bruta apresentou hidrofiliidade em um tempo superior a 3 minutos, quanto os corpos de prova utilizados como controle dos testes dos auxiliares químicos. Os corpos de prova citados como teste de tampão e teste de auxiliares químicos foram submetidos ao processo de biopurga com preparação, sendo que no controle do teste de tampão foi utilizado somente água e no chamado “tampão” somente o tampão. Para o teste dos auxiliares químicos, o controle foi utilizado somente tampão e no chamado “auxiliares” foi utilizado, conforme a etapa, água ou tampão, adicionado de auxiliares químicos.

O corpo de prova submetido à purga alcalina apresentou hidrofiliidade instantânea. A biopurga *all in*, para xilanase, não apresentou hidrofiliidade instantânea, tanto para a temperatura testada a 50°C quanto para a 60°C, indicando que permaneceu material hidrofóbico na superfície da fibra, entretanto o menor tempo para a umectação ocorreu com o processo no qual foi utilizado a Pulpzyme HC, a 50°C.

A biopurga com preparação, utilizando xilanase apresentou hidrofiliidade instantânea somente a 60°C, entretanto deve-se considerar que no tempo de processo utilizado este resultado se deve somente ao tampão e produtos químicos utilizados, pois a xilanase apresentou estabilidade num tempo máximo de 15 minutos.

Os corpos de prova submetidos à biopurga com preparação a 50°C utilizando Pulpzyme HC, apresentaram hidrofiliidade instantânea. Resultado semelhante ao encontrado por Hartzell e Hsieh (1998) quando aplicado pré-tratamento com água a 100°C antes da etapa enzimática. Deve-se considerar que, num tempo de processo de 30 minutos, ocorreu aumento da hidrofiliidade das enzimas na biopurga com preparação, comparativamente à *all in*, sendo o efeito desejado de hidrofiliidade instantânea obtido com a Pulpzyme HC. Supõe-se que este aumento ocorra devido à remoção de sais das fibras e do material graxo, pela etapa de

preparação. Na biopurga *all in*, estas substâncias permanecem em suspensão no mesmo banho que a enzima, o que corrobora a hipótese anterior.

Tabela 4.47. Média de hidrofiliidade para os tipos de purga estudados.

Purga	Corpo de prova	Tempo de hidrofiliidade	
		50°C	60°C
Teste do Tampão	Controle	HI	2 s 11 centésimos
	Tampão	HI	HI
Teste dos auxiliares químicos	Controle	> 3 minutos	> 3 minutos
	Auxiliares	HI	HI
Enzimática <i>all in</i>	Controle Xilanase	2 s 46 centésimos	16 s 81 centésimos
	Xilanase	2 s 82 centésimos	14 s 02 centésimos
	Controle Pulpzyme HC	2 s 52 centésimos	-
	Pulpzyme HC	1 s 18 centésimos	-
Enzimática com preparação	Controle Xilanase	1 s 29 centésimos	HI
	Xilanase	3 s 08 centésimos	HI
	Controle Pulpzyme HC	HI	-
	Pulpzyme HC	HI	-

* Malha crua hidrofiliidade > 3 minutos; malha após purga alcalina (padrão) teve hidrofiliidade instantânea, HI = Hidrolifidade instantânea.

A Figura 4.43 ilustra as variações encontradas no grau de alvura, para os corpos de prova, após os processos de biopurga com substâncias químicas auxiliares, solução tampão glicina-NaOH - pH 9,0 - e xilanase, realizada a 50°C e 60°C, utilizando a purga alcalina como padrão.

Observa-se que todos os processos de biopurga, a 50°C e 60° apresentaram grau de alvura inferior ao do padrão (purga alcalina) e três vezes maior que o da malha bruta, que foi, em média, 11,27°Berger. Os testes com tampão e auxiliares, a 50°C e 60°C, também apresentaram grau de alvura inferior ao padrão. A biopurga *all in* mostrou grau de alvura inferior a biopurga com preparação.

Na Figura 4.44 é apresentado o grau de alvura, após processamento a 50°C, dos corpos de prova utilizados na biopurga com auxiliares químicos, solução tampão glicina-NaOH - pH 9,0, xilanase e Pulpzyme HC, comparado ao padrão. Observa-se que a biopurga com preparação, para ambas as enzimas, apresentou um pequeno aumento no grau de alvura em relação à biopurga *all in*, entretanto os resultados foram inferiores ao obtido para o padrão.

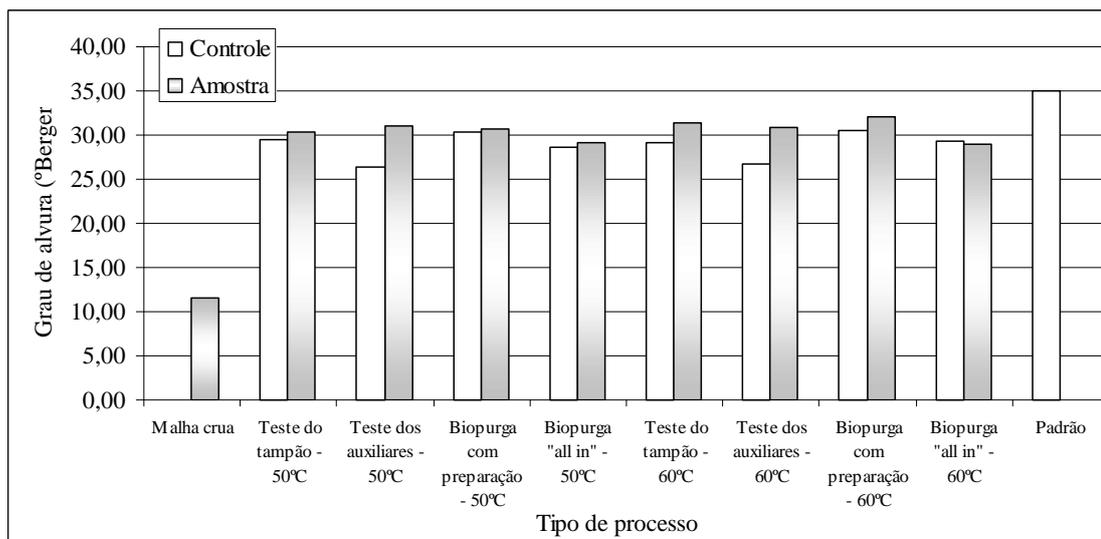


Figura 4.43. Grau de alvura nos corpos de prova após os ensaios preliminares de biopurga, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, sob diversas condições, tendo os corpos de prova da purga alcalina como padrão.

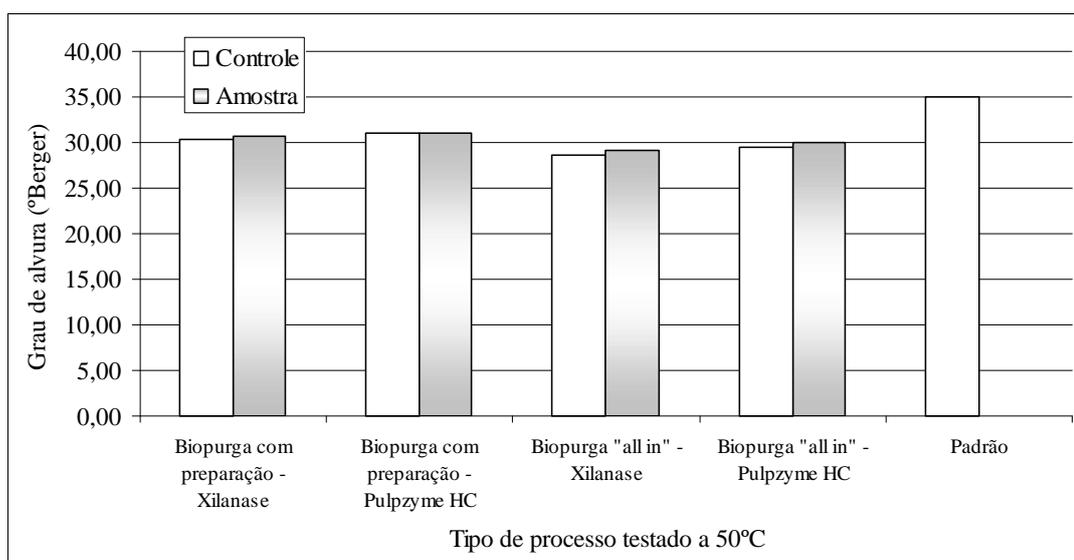


Figura 4.44. Grau de alvura nos corpos de prova após os ensaios preliminares de biopurga, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, com preparação e *all in*, sendo a purga alcalina o padrão.

A perda de massa nos corpos de prova, realizada a 50°C e 60°C, após os processos de biopurga com substâncias químicas auxiliares, solução tampão glicina-NaOH - pH 9,0 - e xilanase, utilizando os corpos de prova da purga alcalina como padrão é apresentada na Figura 4.45. Observa-se que os processos de biopurga e testes com tampão e substâncias químicas auxiliares apresentaram menor perda de massa que o padrão. A purga alcalina utilizada como

padrão apresentou a maior perda de massa. A maior perda de massa da biopurga *all in* a 50°C em relação a 60°C, se deve à desativação da enzima nos primeiros 15 minutos de processo, a 60°C. Observa-se a influência da temperatura empregada no processo no teste dos auxiliares, pois a perda de massa foi maior a 60°C.

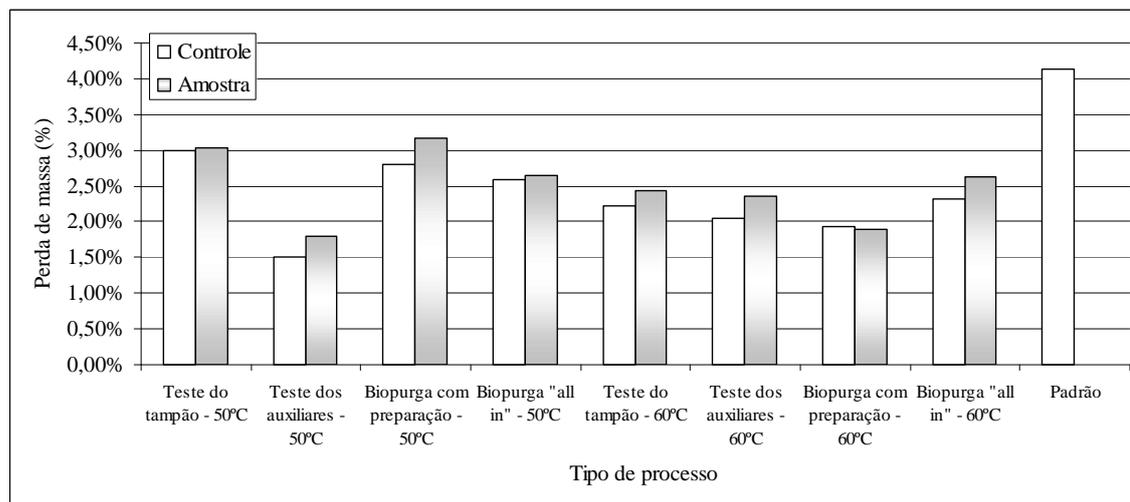


Figura 4.45. Perda de massa nos corpos de prova após os ensaios preliminares de biopurga, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, sob diversas condições, sendo a purga alcalina o padrão.

A Figura 4.46 mostra que a perda de massa nos corpos de prova após o processo de biopurga com xilanase e Pulpzyme HC, realizado a 50°C, foi inferior aos da purga alcalina, sendo a perda de massa do processo de purga alcalina utilizada como padrão. Quanto à perda de massa devido ao processo enzimático, verifica-se que não houve diferença significativa entre a biopurga *all in*, com xilanase e Pulpzyme HC, em relação ao controle. Para a biopurga com preparação, verifica-se que ocorreu diferença na perda de massa entre o controle e os corpos de prova que tiveram atuação da xilanase e Pulpzyme HC. Esta pequena variação entre o tampão e enzima, também foi verificado por Csiszár *et al.* (2001a), quando utilizou Pulpzyme HC (Novozymes), com atividade endoxilanase, sob as condições pH 7,0 (tampão fosfato), 50°C, agitação mecânica de 40 ± 2 rpm, 1 g/L de surfactante não iônico. Entretanto em outro trabalho Csiszár *et al.* (2001b), utilizando as mesmas condições experimentais, verificaram a perda de massa significativa entre o controle e a enzima.

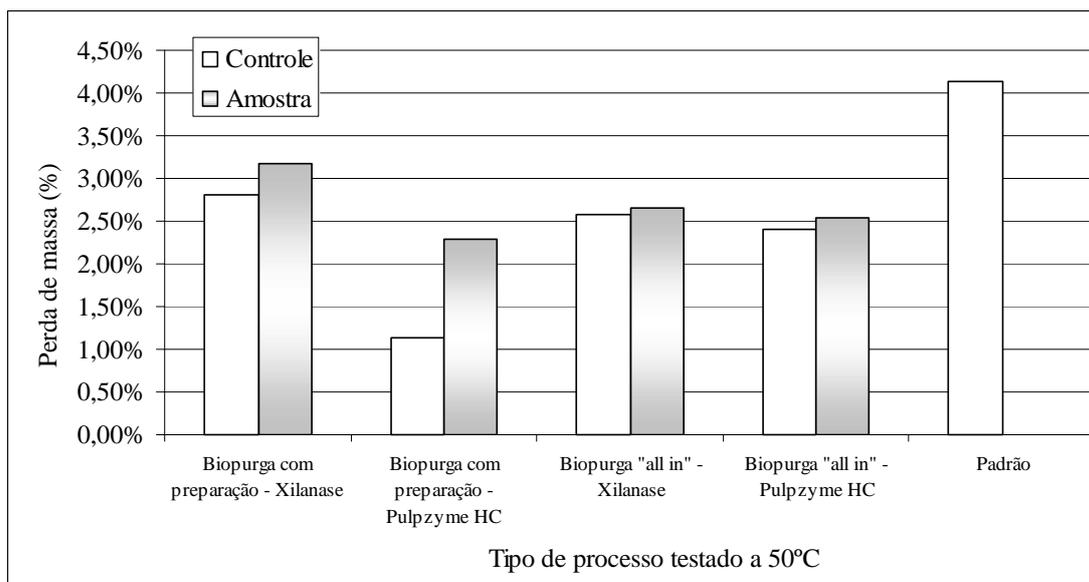


Figura 4.46. Perda de massa nos corpos de prova após os ensaios preliminares de biopurificação, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, com preparação e *all in*, sendo a purga alcalina o padrão.

4.9.2. Ensaios com o Caldo Bruto Estabilizado

Inicialmente foi feita a análise estatística dos planejamentos experimentais executados para determinar as condições efetivamente capazes de conferir estabilidade ao caldo bruto centrifugado, na biopurificação. Após os ensaios de biopurificação os corpos de prova foram submetidos às análises de grau de alvura, perda de massa e hidrofiliabilidade.

Os resultados de hidrofiliabilidade são apresentados na Tabela 4.48. Nota-se que somente o controle da purga alcalina não apresentou hidrofiliabilidade instantânea, aproximadamente 24 segundos e 44 centésimos. Para todas as biopurgas, tanto o controle como a amostra, apresentaram hidrofiliabilidade instantânea, como a amostra da purga alcalina, que foi usado como padrão de referência.

O grau de branco e as coordenadas de cor são apresentadas na Tabela 4.49. Para facilitar a visualização da quantidade de cor removida das amostras, o grau de branco foi graficado e é apresentado na Figura 4.47. O corpo de prova submetido à purga enzimática tem menor grau de branco que o submetido a purga alcalina, pois a purga alcalina é mais agressiva e não específica, removendo as ceras, pigmentos e piolhos da superfície do corpo de prova.

Os corpos de prova biopurgados apresentaram valores similares de grau de alvura, bem como valores de a^* e b^* .

Tabela 4.48. Hidrofilidade conferida aos corpos de prova conforme o tipo de processo.

Processo	PA	PE3CBX	PE5CBX	PE3P	PE5P
Controle	00:00:23.45	HI	HI	HI	HI
	00:00:26.35	HI	HI	HI	HI
	00:00:23.53	HI	HI	HI	HI
Média	00:00:24.44	HI	HI	HI	HI
Amostra	HI	HI	HI	HI	HI
	HI	HI	HI	HI	HI
	HI	HI	HI	HI	HI
Média	HI	HI	HI	HI	HI

* Malha crua hidrofilidade > 3 minutos; malha após purga alcalina (padrão) teve hidrofilidade instantânea, HI = Hidrolifidade instantânea; PA = purga alcalina; PE3CBX = purga enzimática com caldo bruto centrifugado contendo 3 g/L de umectante; PE5CBX = purga enzimática com caldo bruto centrifugado contendo 5 g/L de umectante; PE3P = purga enzimática com Pulpzyme HC contendo 3 g/L de umectante; PE5P = purga enzimática com Pulpzyme HC contendo 5 g/L de umectante.

O branco ideal definido através das coordenadas colorimétricas do sistema CIE deve possuir valor de croma igual a 0 (a^* e b^*) e o de luminosidade (L^*) igual a 100. Portanto a brancura de um tecido depende tanto de sua luminosidade quanto de sua tonalidade. A Tabela 4.49 apresenta o grau de alvura e coordenadas colorimétricas conferidas aos corpos de prova pela purga alcalina e enzimática. Observa-se que todos os processos de purga aumentaram a luminosidade dos corpos de prova, e o maior valor foi alcançado pela purga alcalina. Dentre os valores de croma obtidos, o mais relevante para análise é o $-b^*$ a $+b^*$ (azul-amarelo), pois a cor azul confere, aspecto limpo e a cor amarela, aspecto sujo. Assim, o algodão bruto apresentou croma $+b^* = 14,70$, portanto aspecto sujo (conferido pelos pigmentos e ceras presentes nas fibras do algodão bruto). Após os processos de purga, nota-se que a amostra da purga alcalina apresentou o menor valor de $+b^* = 9,87$, portanto um valor mais próximo do azul, e consequentemente do aspecto limpo. Dentre os processos de purga utilizados, a que apresentou esse aspecto limpo foi a amostra submetida a purga enzimática com caldo bruto centrifugado. A média dos resultados de $+b^*$ foram bastante próximos, para 3 e 5 g/L de umectante, 10,08 e 10,06, respectivamente. Para a Pulpzyme HC, os resultados apresentaram um aspecto positivo para o aumento da concentração de umectante utilizada, para 3 e 5 g/L de umectante, 10,39 e 10,17, respectivamente.

Quanto ao grau de alvura, as amostras de purga enzimática, demonstraram que o aumento da concentração de umectante, teve efeito positivo. Tanto para o caldo bruto

centrifugado quanto para a Pulpzyme HC, o aumento da concentração de 3 para 5 g/L aumentaram o grau de alvura, sendo mais expressivo esse aumento para a Pulpzyme HC.

Tabela 4.49. Grau de alvura e coordenadas de cor conferida aos corpos de prova conforme o tipo de processo.

Tipo de processo	Dados				Grau de alvura (CIE)	
	L*	a*	b*	C*		
PA	Controle	87,83	1,79	11,11	11,25	16,32
		87,90	1,78	11,11	11,25	17,52
		88,00	1,73	11,25	11,38	17,10
	Amostra	90,36	1,12	9,94	10,01	29,39
		90,46	1,10	9,84	9,90	30,12
		90,48	1,15	9,83	9,90	30,21
PE3CBX	Controle	88,28	1,43	10,45	10,55	21,64
		88,17	1,44	10,34	10,44	21,89
		87,93	1,54	10,72	10,83	19,45
	Amostra	88,63	1,36	10,08	10,17	24,29
		88,66	1,36	9,97	10,07	24,88
		88,42	1,38	10,21	10,30	23,15
PE5CBX	Controle	88,22	1,43	10,43	10,52	21,59
		88,25	1,42	10,40	10,50	21,78
		88,33	1,40	10,40	10,50	21,97
	Amostra	88,84	1,32	10,00	10,08	25,22
		88,56	1,36	10,16	10,25	23,75
		88,72	1,28	10,01	10,09	24,85
PE3P	Controle	88,44	1,36	10,15	10,24	23,47
		88,38	1,47	10,34	10,44	22,44
		88,47	1,40	10,26	10,36	23,01
	Amostra	88,31	1,37	10,34	10,43	22,23
		88,16	1,45	10,37	10,47	21,70
		88,19	1,45	10,47	10,57	21,27
PE5P	Controle	88,35	1,14	10,32	10,42	22,44
		88,81	1,32	10,15	10,23	24,44
		88,20	1,46	10,49	10,60	21,21
	Amostra	88,67	1,34	9,98	10,07	24,85
		88,47	1,35	10,16	10,25	23,51
		88,55	1,42	10,36	10,46	28,20
Algodão bruto		85,49	2,34	15,04	15,22	-7,84
		85,76	2,21	14,70	14,87	-5,51
		85,96	2,21	14,64	14,81	-4,67
		85,74	2,26	14,77	14,94	-5,87
		85,84	2,16	14,33	14,49	-3,46

Leituras de grau de alvura em Espectrofotômetro (Método Ganz). Ensaios realizados em ambiente à temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e UR (%) = 65 ± 2 . Padrão: porcelana. PA = purga alcalina; PE3CBX = purga enzimática com caldo bruto centrifugado contendo 3 g/L de umectante; PE5CBX = purga enzimática com caldo bruto centrifugado contendo 5 g/L de umectante; PE3P = purga enzimática com Pulpzyme HC contendo 3 g/L de umectante; PE5P = purga enzimática com Pulpzyme HC contendo 5 g/L de umectante.

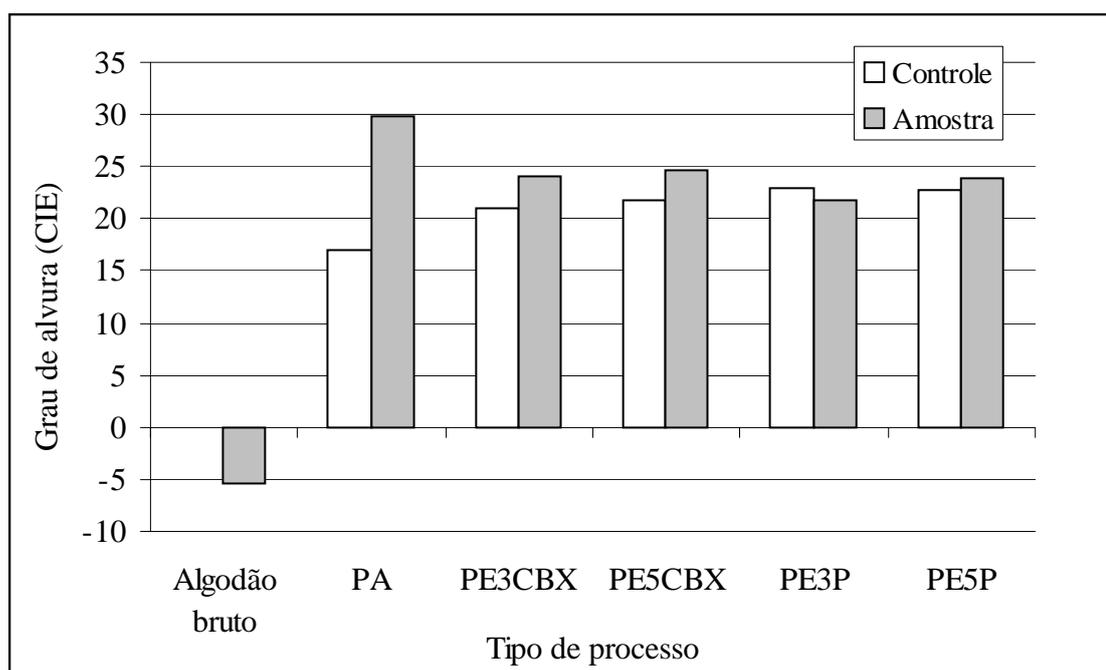


Figura 4.47. Grau de alvura nos corpos de prova após o processo enzimático, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, purga enzimática com caldo bruto centrifugado estabilizado contendo 3 g/L de umectante (PE3CBX) e 5 g/L de umectante (PE5CBX), com Pulpzyme HC contendo 3 g/L de umectante (PE3P) e 5 g/L de umectante (PE5P), tendo os corpos de prova da purga alcalina (PA) como padrão.

A Tabela 4.50 mostra a perda de massa nos corpos de prova após serem submetidos aos processos e a Figura 4.48 ilustra esses resultados de perda de massa na forma gráfica. Percebe-se que a purga alcalina apresentou maior perda de massa e o corpo de prova denominado controle apresentou resultado semelhante aos obtidos para as biopurgas. Os resultados dos processos de biopurga se confundem. O controle, para todos os processo de biopurga, foram semelhantes, o que induz a afirmação que a concentração de 1,0 M de sorbitol presente no banho não influenciou no processo. Nota-se que os resultados dos diferentes tratamentos, em função da variabilidade, podem ser considerados semelhantes, e que o uso de 3 ou 5 g/L de umectante tem o mesmo resultado, portanto o seu uso em menor quantidade se torna economicamente viável.

Tabela 4.50. Perda de massa (%) conferida aos corpos de prova conforme o tipo de processo.

Processo	PA	PE3CBX	PE5CBX	PE3P	PE5P
Controle	2,73	2,84	2,62	2,67	2,53
	2,87	2,46	2,63	2,64	2,70
	2,63	2,52	2,68	2,53	2,83
Média	2,74	2,61	2,65	2,61	2,69
Amostra	4,20	2,82	2,87	3,16	2,89
	4,19	2,81	3,00	3,00	2,94
	4,17	2,97	3,05	3,27	3,05
Média	4,19	2,87	2,97	3,15	2,96

PA = purga alcalina; PE3CBX = purga enzimática com caldo bruto centrifugado contendo 3 g/L de umectante; PE5CBX = purga enzimática com caldo bruto centrifugado contendo 5 g/L de umectante; PE3P = purga enzimática com Pulpzyme HC contendo 3 g/L de umectante; PE5P = purga enzimática com Pulpzyme HC contendo 5 g/L de umectante.

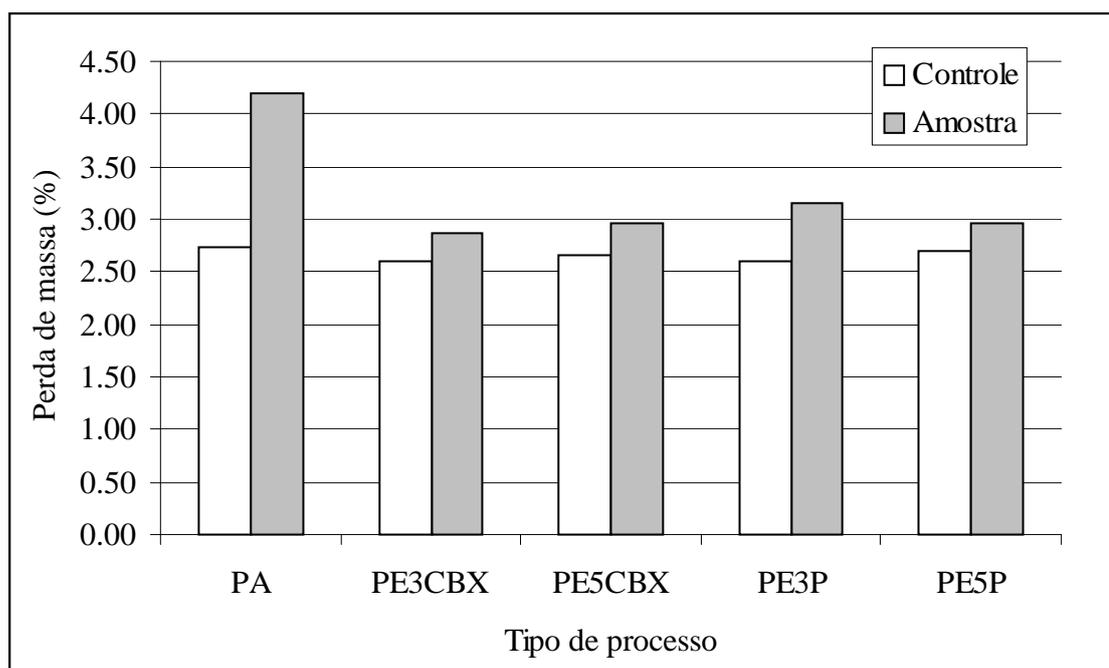


Figura 4.48. Perda de massa nos corpos de prova após o processo enzimático, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, purga enzimática com caldo bruto centrifugado estabilizado contendo 3 g/L de umectante (PE3CBX) e 5 g/L de umectante (PE5CBX), com Pulpzyme HC contendo 3 g/L de umectante (PE3P) e 5 g/L de umectante (PE5P), tendo os corpos de prova da purga alcalina (PA) como padrão.

4.9.3. Avaliação dos Efeitos do Caldo Bruto Estabilizado na Biopurga

Apesar dos ensaios terem diferentes características de tempo de incubação e quantidade de agentes tensoativos, e no caso do ensaio com a enzima estabilizada, presença de 1,0 M de sorbitol, pode-se perceber que as mudanças realizadas após os testes preliminares para a realização dos ensaios com a enzima estabilizada atingiram os resultados esperados, ou seja: a hidrofiliabilidade se tornou instantânea, independente do tipo de enzima utilizada na biopurga com preparação a 50°C, durante 60 minutos. Entretanto, esse tempo, em processo industrial é considerado longo, devendo ser determinado o menor intervalo tempo de processo que atenda aos padrões mínimos de umectabilidade exigidos pela indústria.

O grau de branco, apresentado nos ensaios preliminares como média, foram conferidos por processos que utilizaram as condições operacionais usadas no processo convencional e não mostraram diferença entre o controle e a amostra. Quando os ensaios foram realizados nas condições ótimas para atuação das enzimas nota-se diferenças significativas entre controle e resposta, principalmente para a xilanase. Nota-se que as mesmas condições utilizadas para a preparação enzimática Pulpzyme HC não foram favoráveis, indicando que mesmo que o componente enzimático de uma preparação seja o mesmo, não significa que a condição determinada é aplicável.

A perda de massa apresentou grande variabilidade tanto nos ensaios denominados preliminares quanto nos com caldo estabilizado. Essa variabilidade se deve a presença dos piolhos e fibras que acabam se desprendendo.

4.9.4. Considerações

As principais contribuições desse trabalho nos estudos de estabilidade térmica e nos ensaios de estabilização do caldo bruto centrifugado de *B. pumilus* CBMAI 0008 serão comentadas a seguir. Também serão apresentados os resultados da influência de agentes tensoativos e químicos sobre a atividade enzimática, bem como a aplicação do caldo bruto nas condições ótimas do processo de biopurga com preparação.

Observou-se que a atividade enzimática máxima, em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, foi alcançada a 55°C, enquanto a bibliografia cita como sendo 60°C. Como a diferença entre os valores das atividades foi pequena, pode-se considerar praticamente a mesma atividade, mas deve-se considerar que o decaimento da atividade enzimática, devido a

esse incremento de 5°C, pode ser bastante significativo quando o tempo de incubação é considerado.

A Tabela 4.51 apresenta o resumo dos parâmetros da estabilidade térmica para o caldo bruto centrifugado e para a Pulpzyme HC.

Tabela 4.51. Resumo dos parâmetros da estabilidade térmica.

Enzima	Caldo bruto centrifugado	Pulpzyme HC
Estabilidade	100%	40°C - 90 min
	≈ 50%	50°C - 45 min
E _a [kcal/mol]	pH 8,0	7,23
	pH 9,0	10,25
E _d [cal/mol]	pH 9,0	19.969,54
t _{1/2} [min]	40°C	551
	50°C	38
Modelo de decaimento	$K_d = 8,222932.10^3 \exp(Ed/RT)$	$K_d = 9,334706.10^{18} \exp(Ed/RT)$

Nos testes que foram avaliados os efeitos de inibição ou ativação na atividade enzimática quando submetidos à incubação na presença de aditivos químicos, na concentração 5 mM, verificou-se que o CuSO₄ apresentou o maior efeito inibitório (atividade remanescente média 2,40%) enquanto o (NH₄)₂SO₄ promoveu a maior ativação da atividade (atividade remanescente média 126,77%).

Conforme se desejava comprovar dentre as substâncias disponíveis nos processos têxteis para ajuste de pH alcalino, sem adição de estabilizantes, verificou-se que o pH ajustado com carbonato-bicarbonato de sódio apresenta efeito negativo e quase totalmente inibitório da atividade (17,66 U e 6,59 U, antes e após tratamento térmico de uma hora, respectivamente, dados apresentados no Anexo A) indicando que seu uso para correção do pH em processo enzimático seria inadequado.

Utilizando-se o NaOH a atividade remanescente média foi de 69,68% (112,97 U e 78,73 U, antes e após tratamento térmico de uma hora, respectivamente, dados apresentados no Anexo A). A solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, utilizada como controle, foi de 43,69% (184,58 U e 80,57 U, antes e após tratamento térmico de uma hora, respectivamente, dados apresentados no Anexo A). Para demonstrar que a correção do pH é necessária e fundamental em processos enzimáticos, água destilada foi testada com seu pH natural (aproximadamente

6,00). Verificou-se que a atividade sofre diminuição, média aproximada de atividade remanescente 67,84% (44,99 U e 30,50 U, antes e após tratamento térmico de uma hora, respectivamente, dados apresentados no Anexo A), mas esta não é tão brusca como quando utilizado a mistura carbonato-bicarbonato de sódio.

A partir da MSR obteve-se as condições ideais, com atividade máxima remanescente de 62,94%, em 37,5 minutos de incubação, com 2 g/L de agente emulsificante e 5 g/L de agente umectante. Assim, para os ensaios de biopurga foram testadas as condições: concentração de sorbitol 1,0 M, com agitação, 3 e 5 g/L de umectante, em 60 minutos de incubação e como a influência do emulsificante não foi significativa, utilizou-se nos ensaios 1 g/L.

Os corpos de prova com características ideais devem apresentar hidrofiliidade instantânea, o maior grau de alvura possível e pouca perda de massa. Na avaliação do desempenho da biopurga, em relação ao processo de purga alcalina, os resultados mostraram que na purga alcalina os tecidos de algodão apresentam maior grau de alvura, mas também a maior perda de massa, em relação a biopurga, para as diferentes condições de processo utilizadas. O uso de 3 ou 5 g/L de umectante na purga enzimática promove diferença significativa no grau de alvura.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

Neste trabalho avaliou-se a possibilidade de estabilização do caldo bruto de *B. pumilus* CBMAI 0008 para possibilitar sua aplicação na indústria têxtil. Entretanto, verificou-se que a aplicação individualizada desta enzima não gera resultados capazes de suprir as exigências mínimas necessárias para o produto têxtil acabado. Por isso, o enfoque do trabalho foi a avaliação da influência da interação entre a enzima e os agentes tensoativos, possíveis produtos químicos utilizáveis para correção de pH e também os efeitos inibitórios de íons, possivelmente presente nas fibras de algodão que afetariam a atividade da enzima. Os objetivos propostos foram atingidos, porém, muitos aspectos ainda devem ser estudados (apresentados no Capítulo 6 – Sugestões para trabalhos futuros).

Com base nestes resultados sugere-se que a temperatura ideal para o processo de biopurga com o substrato têxtil deve ser no intervalo de 40-50°C. Entretanto, quanto menor a temperatura empregada no processo, maior deverá ser o tempo de incubação utilizado ou a concentração de enzima utilizada. Para o processo de inativação, a temperatura deve ser entre 70-90°C, com um tempo máximo de 15 minutos.

Os polióis utilizados, glicerol, sorbitol e xilitol conferiram aumento na estabilidade a 50°C, sendo o sorbitol o que proporcionou melhor resultado dentre as condições estudadas.

O efeito dos agentes químicos testados (íons e EDTA), na concentração 5 mM, sobre a atividade remanescente em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, mostrou que os íons divalentes apresentaram maior efeito inibitório em relação aos íons monovalentes. O efeito mais inibitório foi ocasionado pelo CuSO₄ enquanto o (NH₄)₂SO₄ promoveu a maior ativação na atividade remanescente média.

Dentre as substâncias testadas para ajuste de pH alcalino, sem adição de estabilizantes, verificou-se que o pH ajustado com carbonato-bicarbonato de sódio apresenta efeito negativo e quase totalmente inibitório da atividade. Portanto seu uso para correção do pH em processo enzimático seria inadequado. Assim, apesar de diminuir a atividade enzimática o NaOH seria mais adequado.

Dentre as várias combinações de efeitos estudadas, para os agentes tensoativos (emulsificante e umectante); o umectante e o tempo, apresentaram influência significativa sobre a atividade remanescente. A condição ótima foi determinada através da MSR. Assim,

para os ensaios de biopurga foram testadas as condições: concentração de sorbitol 1,0 M, com agitação, 3 e 5 g/L de umectante, em 60 minutos de incubação.

Os corpos de prova resultantes da purga alcalina apresentaram maior grau de alvura, perda de massa. Todos os processos, nas condições testadas, conferiram hidrofiliidade instantânea. O efeito positivo do aumento de concentração de umectante de 3 para 5 g/L, foi observado com maior facilidade no grau de alvura. Esse efeito foi positivo tanto para o caldo bruto centrifugado quanto para a Pulzyme HC.

CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se para a continuidade desse trabalho a avaliação dos seguintes aspectos:

- Testar a xilanase combinada com as enzimas celulase, pectinase e lipase, na biopurga, para determinar as melhores condições operacionais (concentração de enzima, pH (ácido e neutro), temperatura, tempo, concentração de agentes tensoativos, etc.) que possibilitem obter produtos acabados com melhor grau de alvura, toque, resistência, etc.
 - Comparar o efeito do tingimento dos corpos de prova tratados pelo processo enzimático (empregando *pool* enzimático) e alcalino, quanto à solidez a luz e a lavagem;
 - Imobilizar a enzima xilanase de *B. pumilus* CBMAI 0008 em diversos suportes (óxido de estanho, polímeros, emulsões, etc) e determinar as propriedades catalíticas, nas condições de processo, após a imobilização com a finalidade de reutilização;
 - Comprovar a redução da toxicidade do efluente da purga enzimática em relação ao efluente da purga alcalina, através de testes com bioindicadores;
 - Realizar a análise do ciclo de vida do produto, tanto aquele submetido ao processo enzimático quanto o submetido ao processo alcalino;
 - Testar o número de ciclos que a enzima pode ser empregada sem perder a estabilidade e conseqüentemente a atividade.
 - Testar a adição de proteínas para melhorar a estabilidade.
-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGUIAR NETO, P. P. *Fibras têxteis*. Rio de Janeiro: SENAI-DN: SENAI-CETIQT: CNPq: IBICT: PADCT:TIB, 1996.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, v. 33, p. 21-28, 1998.

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.

ANTHONY, T.; RAJ K. C.; RAJENDRAN, A.; GUNASEKARAN, P. High molecular weight cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* AR1. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p. 647–654, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13000: Material têxtil – Determinação da hidrofiliidade de tecidos. Rio de Janeiro: ABNT, 1993. 2 p.

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.

AZEVEDO, H.; BISHOP, D.; CAVACO-PAULO, A. Effects of agitation level on the adsorption, desorption, and activities on cotton fabrics of full length and core domains of EG V

(*Humicola insolens*) and CenA (*Cellulomonas fimi*). *Enzyme and Microbial Technology*, n.27, p. 325-329, 2000.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUSTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, n. 23, p. 257-270, 1992.

BARCELLOS, I. O.; MORGADO, J.; CAVACO-PAULO, A. Tratamento enzimático antes ou após o tingimento? *Química Têxtil*, n. 21, p. 75-77, 1999.

BAYER, E.; CHANZY, H.; LAMED, R.; SHOHAM, Y. Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 8, p. 548-557, 1998.

BEG, Q. K.; BHUSHAN, B.; KAPOOR, M.; HOONDAL, G. S. Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 24, p. 396-402, 2000.

BELGHITH, H.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; GARGOURI, A. Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Pol 6) cellulases. *Journal of Biotechnology*, v. 89, p. 257-262, 2001.

BHARDWAJ, N. K.; BAJPAI, P.; BAJPAI, P. K. Use of enzymes in modification of fibres for improved beatability. *Journal of Biotechnology*, v. 51, p. 21-26, 1996.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, v.15, n. 3/4, p. 583-620, 1997.

BIOTIMES, *Biopreparation* - suave no algodão e no meio ambiente. September 1999, n. 3, p. 10-11. Fonte online: http://www.novo.dk/enzymes/Industries_Textile.htm

BITTENCOURT FILHA, A. M. B.; COSTA, V. G.; BIZZO, H. R. Avaliação da qualidade de detergentes a partir do volume de espuma formado. *Química Nova na Escola - Determinação da Qualidade de Detergentes*, n. 9, p. 43-45, maio 1999.

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.

BURHAN, A.; NISA, U.; GÖKHAN, C.; ÖMER, C.; ASHABIL, A.; OSMAN, G. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 1397-1403, 2003.

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

BUSCHLE-DILLER, G. Tratamento enzimático das fibras protéicas. Seminário Internacional de Aplicação da Biotecnologia na Indústria Têxtil. *Proceedings/Anais*. Universidade Regional de Blumenau, Departamento de Química. 2001a.

BUSCHLE-DILLER, G. Environmentally friendly bioscouring process. Seminário Internacional Aplicação da Biotecnologia na Indústria Têxtil. *Proceedings/Anais*. Universidade Regional de Blumenau, Departamento de Química. 2001b.

CALAFELL, M.; GARRIGA, P. Effect of some process parameters in the enzymatic scouring of cotton using an acid pectinase. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 34, p. 326-331, 2004.

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

CEGARA, J. Biotecnologia aplicada aos processos de química têxtil. Tradução Agostinho S. Pacheco. *Química Têxtil*, v. 58, mar. 2000.

CIBA, Informativo – Acabamentos easy-care sobre tecidos 100% CO. Edição de 1994.

CLARIANT, S. A. *Química Têxtil*, n. 64, set. 2001.

COBOS, A.; ESTRADA, P., Effect of polyhydroxylic cosolvents on the thermostability and activity of xylanase from *Trichoderma reesei* QM 9414. *Enzyme and Microbial Technology*, n. 33, p. 810-818, 2003.

COMOLI-LAMBERTI, B., Utilização de enzimas no tratamento de confeccionados. Tradução: Mário Gilberto Cortopassi. *Textília*, n. 31, 1999.

CONTI, R.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Biocatálise: avanços recentes. *Química Nova*, v. 24, n. 5, p. 672-675, 2001.

CONTRERAS, R. D. Interação de enzima e tensoativo não-iônico no biocabamento. *Química Têxtil*, n. 65, p. 68-72, dez. 2001. Tradução: Agostinho S. Pacheco.

CORTEZ, J. M.; ELLIS, J.; BISHOP, D. P. Cellulase finishing of woven, cotton fabrics in jet and winch machines. *Journal of Biotechnology*, v. 89, p. 239-245, 2001.

CORTEZ, J. M.; ELLIS, J.; BISHOP, D. P. Using cellulases to improve the dimensional stability of cellulosic fabrics. *Textile Research Journal*, v. 72, n. 8, p. 673-680, 2002.

COSTA, S. A.; TZANOV, T.; CARNEIRO, A. F.; PAAR, A.; GÜBITZ, G. M.; CAVACO-PAULO, A. Studies of stabilization of native catalase using additives. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, p. 387-391, 2002.

COSTA, J. N.; ALMEIDA, F. A. C.; SANTANA, J. C. F.; COSTA, I. L. L.; WANDERLEY, M. J. R.; SANTANA, J. C. S. Técnicas de colheita, processamento e armazenamento do algodão. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Circular técnica*, 87. ISSN 0100-6460. Campina Grande, PB, p. 1-10, agosto 2005.

CHRISTAKOPOULOS, P.; HATZINIKOLAOU, D. G.; FOUNTOUKIDIS, G.; KEKOS, D.; CLAEYSSSENS, M.; MACRIS, B. J. Purification and Mode of Action of an Alkali-Resistant Endo-1,4- β -glucanase from *Bacillus pumilus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 364, n. 1, p. 61-66.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. *Biotechnología: manual de microbiología industrial*. Traducido: Paloma Liras Edín. Zaragoza, España: Editorial Acribia, 1989.

CSISZÁR, E.; SZAKÁCS, G.; RUSZNÁK, I. Combining traditional cotton scouring with cellulase enzymatic treatment. *Textile Research Journal*, v. 68, n. 3, p. 163-167, 1998.

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, 2001a.

CSISZÁR, E.; URBÁNSZKI, K.; SZAKÁCS, G. Biotreatment of desized cotton fabrics by commercial cellulose and xylanase enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, p. 1065-1072, 2001b.

CSISZÁR, E.; LOSONCZI, A.; KOCZKA B.; SZAKÁCS, G.; POMLÉNYI A. Degradation of lignin-containing materials by xylanase in biopreparation of cotton. *Biotechnology Letters*, v. 28, p. 749-753, 2006.

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.

DAMASO, M. C. T.; ANDRADE, C. M. M. C.; JR. PEREIRA, N. Production and properties of the cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, p. 333-338, 2002.

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, jul/dez 1997.

DHILLON, A.; GUPTA, J. K.; KHANNA, S. Enhanced production, purification and characterization of a novel cellulose-poor thermostable, alkalitolerant xylanase from *Bacillus circulans* AB 16. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 849-856, 2000.

DUARTE, M. C. T.; PELLEGRINO, A. C. A.; PORTUGAL, E. P.; PONEZI, A. N.; FRANCO, T. T. Characterization of alkaline xylanases from *Bacillus pumilus*. *Brazilian Journal Microbiology*, v. 31, p. 90-94, 2000.

DUARTE, M. C. T.; PORTUGAL, E. P.; PONEZI, A. N.; BIM, M. A.; TAGLIARI, C. V.; FRANCO, T. T. Production and purification of alkaline xylanases. *Bioresource Technology*, v. 68, p. 49-53, 1999.

FERREIRA, N. R.; VISSOCI, G.; PENHA-SILVA, N. Efeito da concentração de glicerol, sacarose, sarcosina e sorbitol sobre a extinção molar em 281,5 nm de N-acetil-D, L-triptofano

etil éster e N-acetil-D, L-tirosina etil éster. *Bioscience Journal*, v. 20, n. 2, p. 83-91, may/aug. 2004.

GALHANI, M. A. P. As Fibras e suas características. *Textília*, n. 10, p. 50, 1993.

GAWANDE, P.V.; KAMAT, M.Y. Preparation, characterization and application of *Aspergillus* sp. xylanase immobilized on Eudragit S-100. *Journal of Biotechnology*, n. 66, p. 165–175, 1998.

GEORGE, S.; AHMAD, A.; RAO, M. A novel thermostable xylanase from *Thermomonospora* sp.: influence of aditives on thermostability. *Bioresource Technology*, v. 78, p. 221-224, 2001.

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

GHOSH, M.; NANDA, G. Purification and Some Properties of a Xylanase from *Aspergillus sydowii* MG49. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 4620-4623, 1994.

GÜBITZ, 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.

HARTZELL, M. M.; HSIEH, Y.-L. Enzymatic scouring to improve cotton fabric wettability. *Textile Research Journal*, v. 68, n. 4, p. 233-241, 1998.

HECK, J. X.; FLÔRES, S. H.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Statistical optimization of thermo-tolerant xylanase activity from Amazon isolated *Bacillus circulans* on solid-state cultivation. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 1902-1906, 2006.

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.

HSIEH, Y.-L.; CRAM, L. Proteases as scouring agents for cotton. *Textile Research Journal*,

v. 69, n. 8, p. 590-597, 1999.

HOLME, I. Acabamentos funcionais em tecidos de algodão. Tradução: Francisco Ferreira. *Textília*, n. 56, abr/mai/jun 2005.

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.

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, jul/out 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.

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

KOO, H.; UEDA, M.; WAKIDA, T.; YOSHIMURA, Y.; IGARASHI, T. Cellulase treatment of cotton fabrics. *Textile Research Journal*, v. 64, n. 2, p. 70-74, 1994.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 23, p. 411-456, 1999.

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

LEÃO, M. D.; CARNEIRO, E. V.; SCHWABE, W. K.; RIBEIRO, E. D. L.; SOARES, A. F. S.; FERNANDES NETO, M. L.; TORQUETTI, S. S. C. Controle ambiental na indústria têxtil: acabamento de malhas. Belo Horizonte: Projeto Minas Ambiente, 2002, 356 p.

LEMO, J. L. S.; BON, E. P. S.; SANTANA, M. F. E.; PEREIRA JUNIOR, N. Thermal stability of xylanases produced by *Aspergillus awamori*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, p. 206-211, 2000.

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.

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.

MAMO, G.; HATII-KAUL, R.; MATTIASSON, B. A thermostable alkaline active endo- β -1-2-xylanase from *Bacillus halodurans* S7: purification and characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 1492-1498, 2006.

MANDELS, M. & STENBERG, D. – Recent advances in cellulase technology. *Journal Fermentation Technology*, v. 54, p. 267-286, 1976.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. *Química Nova*, v. 4, n. 1, p. 87-93, 2001.

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

MIZUTANI, C.; SETHUMADHAVAN, K.; HOWLEY, P.; BERTONIERE, N. Effect of a nonionic surfactant on *Trichoderma* cellulase treatments of regenerated cellulose and cotton yarns. *Cellulose*, v. 9, p. 83-89, 2002.

NASCIMENTO, R. P.; COELHO, R. R. R.; MARQUES, S.; ALVES, L.; GÍRIO, F. M.; BOM, E. P. S.; AMARAL-COLLAÇO, M. T. Production and partial characterisation of

xylanase from *Streptomyces* sp. Strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p. 549-555, 2002.

NC-IUBMB - Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/reaction/polysacc/4222.html>, acesso 15/10/2006.

NOVO NORDISK BIOINDUSTRIAL DO BRASIL. Jeans Distintos Com Celulases Seleccionadas. *Química Têxtil*, v. 58, p. 38-41, março 2000.

OLIVEIRA, L. A.; PORTO, A. L. F.; TAMBOURGI, E. B. Produção de xilanase por *Penicillium janthinellum* em diferentes resíduos agroindustriais. *Anais do XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química*. Natal, Rio Grande do Norte, Brasil, 2002.

OSSOLA, M.; GALANTE, Y. M. Scouring of flax rove with the aid of enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 34, p. 177-186, 2004.

PACHECO, A. S. Descrude enzimático do algodão – tensoativos, agitação e seleção de enzimas. *Química Têxtil*, n. 63, junho 2001. Artigo originalmente publicado na Revista Galáxia, Argentina, n. 164, 1999, por LI, Y.; HARDIN, R.

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.

RHODIA-STER. *Manual Técnico de Beneficiamento*. Não possui ano de publicação.

RYAN, S. E.; NOLAN, K.; THOMPSON, R.; GUBTIZ, G. M.; SAVAGE, A. V.; TUOHY, M. G. Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatum*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, p. 775-785, 2003.

SAHA, B. C. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 1279-1284, 2002.

SÁ-PEREIRA, P.; MESQUITA, A.; DUARTE, J. C.; BARROS, M. R. A.; COSTA-FERREIRA, M. Rapid production of thermostable cellulase-free xylanase by a strain of *Bacillus subtilis* and its properties. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, p. 924-933, 2002.

SANDRIM, V. C.; RIZZATTI, A. C. S.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; MILAGRES, A. M. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1823-1828, 2005.

SANGWATANAROJ, U.; CHOONUKULPONG, K.; UEDA, M. Cotton scouring with pectinase and lipase/protease/cellulase. *AATCC Review*, v. 3, n. 5, 2003.

SAPRE, M. P.; JHA, H.; PATIL, M. B. Purification and characterization of a thermoalkalophilic xylanase from *Bacillus* sp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 21, p. 649-654, 2005.

SINGH, S.; PILLAY, B.; PRIOR, B. A. Thermal stability de β -xylanases produced by different *Thermomyces lanuginosus* strains. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 502-508, 2000.

TARAVATI, A.; SHOKRZADEH, M.; EBADI, A. G.; VALIPOUR, P.; TABAR MOLLA HASSAN, A., FARROKHI, F. Various effects of sugar and polyols on the protein structure and function: role as osmolyte on protein stability. *World Applied Sciences Journal*, v. 2, n. 4, p. 353-362, 2007.

TEERI, T. T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Tibtech*, v. 15, p. 160-167, may 1997.

TROTMAN, E. R. *Dyeing and chemical technology of textile fibres*. Charles Griffin & Company Ltda. 6 ed., 1984.

TZANOV, T.; CALAFELL, M.; GUEBITZ, G. M.; CAVACO-PAULO, A. Bio-preparation of cotton fabrics. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 29, p.357-362, 2001.

USSMAN, M. H.; GUILLÉN, J. G. Microestrutura de fibras têxteis: utopia para o

tecnologista têxtil. *Química Têxtil*, v. 61, dezembro 2000.

VIANA, Y. A.; GARROTE FILHO, M. S.; PENHA-SILVA, N. Estabilização de proteínas por osmólitos – review article. *Bioscience Journal*, v. 21, n. 2, p. 83-88, may/aug. 2005.

VOET, D.; VOET, J. G. *Bioquímica*. Tradução: Ana Beatriz Gorino da Veiga et al. 3 ed. Porto Alegre: Artemed, 2006.

XIONG, H., NYSSÖLÄ, A., JÄNIS, J., PASTINEN, O., WEYMARN N, LEISOLA M, TURUNEN O. Characterization of the xylanase produced by submerged cultivation of *Thermomyces lanuginosus* DSM 10635. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, p. 93-99, 2004.

YAMADA, M.; AMANO, Y.; HORIKAWA, E.; NOZAKI, K.; KANDA, T. Mode of action of cellulases on dyed cotton with a reactive dye. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 69, n. 1, p. 45-50, 2005.

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

ZHI, L.; JIANG, Y.; WANG, Y.; HU, M.; LI, S.; MA, Y. Effects of additives on the thermostability of chloroperoxidase. *Biotechnology Progress*, v. 23, p. 729-733, 2007.

GLOSSÁRIO

AGENTE EMULSIFICANTE: diminui a diferença de tensão superficial (repulsão mútua) entre as duas fases, de modo que uma passe a “molhar” a outra (BITTENCOURT FILHA *et al.*, 1999).

AGENTE UMECTANTE: substância surfactante, que aumenta a hidrofiliidade do tecido, por meio da redução da tensão superficial do líquido e causam seu espalhamento sobre a superfície das fibras, deslocando o ar (LEÃO *et al.*, 2002).

ALONGAMENTO: é uma deformação longitudinal, ou seja, é a extensão que a fibra sofre sob o efeito de uma força de tensão. Quando a fibra é submetida ao total de alongamento que ocorre, até o ponto de ruptura da fibra, tem-se o alongamento à quebra. O total de alongamento é um fator importante na avaliação da elasticidade, por isso o alongamento e a elasticidade devem ser considerados conjuntamente na avaliação da fibra (AGUIAR NETO, 1996).

BRILHO: ou lustro é o fator que determina se a fibra é brilhante ou fosca, ou seja, é o resultado do total de luz refletida por uma fibra (AGUIAR NETO, 1996).

DEFEITOS POUCO FREQUENTES: é caracterizado como ponto grosso e fino, que só ocorrem raramente e, para sua determinação, precisa-se ensaiar, no mínimo, 100.000 m de fio (MALUF e KOLBE, 2003).

DENSIDADE: Representa a relação entre massa e volume (g/cm^3). Deve-se considerar que fibras com diferentes densidades e diâmetros iguais, apresentam diferentes poderes de cobertura – capacidade da fibra de cobrir uma superfície. Dependendo da fibra usada, tecidos feitos com fios de mesmo título – mesmo número de fios de trama e urdume – e mesma massa por área, possuem diferença na aparência, flexibilidade, permeabilidade ou passagem do ar e cobertura (GALHANI, 1993; AGUIAR NETO, 1996).

FIABILIDADE: ou qualidade para a fiação ou coesão, é a habilidade apresentada pelas fibras de se manterem unidas durante o processo de manufatura do fio, como resultado do perfil longitudinal da fibra ou da forma da seção transversal, que a habilita a manter-se unida e a aderir adequadamente umas às outras. Esta coesão das fibras confere ao fio determinadas características como finura e ao tecido, finura, aparência, textura, volume, durabilidade, facilidade de manutenção, etc (AGUIAR NETO, 1996).

FIO CARDADO: é o fio fabricado sem passar pela penteadeira, portanto possui mais fibras curtas, por isso propicia maior formação de pilling (bolinhas no tecido) e neps (defeito na

regularidade do fio). (MALUF e KOLBE, 2003).

FLEXIBILIDADE: ou maleabilidade é a capacidade da fibra dobrar-se com pequenos esforços, sem quebra (GALHANI, 1993; AGUIAR NETO, 1996).

FORMA FÍSICA: confere certas diferenças no fio e nas propriedades dos tecidos. A relação comprimento-diâmetro, forma da seção transversal, contorno da superfície e irregularidades são bases para a descrição tanto da aparência macroscópica quanto microscópica da fibra (AGUIAR NETO, 1996).

IMPERFEIÇÕES: dos fios são defeitos casuais e periódicos que acontecem com bastante frequência. Geralmente, são causadas pela matéria-prima do fio ou no processo de preparação inadequado e afetam a aparência dos tecidos planos e de malhas e também informam se o fio que está sendo adquirido é igual, inferior ou superior ao fio normalmente utilizado. O nep (ponto grosso acentuado cujo comprimento é inferior a 4 mm) é uma imperfeição, que afeta consideravelmente a aparência dos tecidos planos e de malhas. Causam problemas na malharia e tingimento (não tingem por grande número de corantes, aparecendo como pontos claros no tecido tingido) (MALUF e KOLBE, 2003).

MOTES: sementes abortadas com fibras verdes e imaturas (COSTA *et al.*, 2005).

NAPS: minúsculos detritos da calaza das sementes que vêm aderidos às fibras (COSTA *et al.*, 2005).

NEPS: minúsculos nós de fibras adelgaçadas e verdes (COSTA *et al.*, 2005).

PILLING: São pequenas bolinhas que se formam na superfície do tecido (CUNHA *et al.*, 2000).

PIOLHO: constituído de pequenos entrelaçamentos de fibras de algodão de vários tamanhos, em mistura com caroços, fragmentos de cascas e de outras substâncias eliminadas durante o descaroçamento (PORTARIA M. A. nº 055).

PILOSIDADE: A pilosidade é a relação de dois comprimentos (comprimento das fibras protraídas/comprimento do campo de medida). A pilosidade H (*Hairiness*, em inglês ou *Haarigkeit*, em alemão) corresponde ao comprimento total de fibras protraídas dentro do campo de medida de 1 cm de comprimento. Na unidade de medida da pilosidade do Regulímetro Uster Tester 3, considera-se a pilosidade de cerca de 1 cm de fio (MALUF e KOLBE, 2003).

PREPARAÇÃO: Convencionou-se como a etapa de lavação com água quente, com ou sem adição de tensoativos, visando melhorar a umectação da fibra para a etapa de pré-tratamento enzimático.

PRÉ-TRATAMENTO: Convencionou-se como a etapa de tratamento da fibra, de forma

convencional ou enzimática, para a etapa de tingimento.

REGAIN: é o massa da água num material, expresso como porcentagem em relação ao massa seco em estufa da amostra. O teor de umidade é o massa da água num material expresso como porcentagem em relação à massa como recebido (amostra úmida) (MALUF e KOLBE, 2003).

RESISTÊNCIA: é uma das principais características das fibras. A força necessária para romper a fibra de algodão varia bastante, dependendo da parede da fibra e das avarias sofridas anteriormente. Somente 30 a 50% da resistência individual da fibra é transferida para o fio. Quando o algodão é molhado, sua resistência aumenta entre 10 e 20%, portanto os cuidados e as técnicas de processo a úmido não necessitam de modificações para compensar uma possível redução da resistência a úmido. A torção é necessária para produzir fios de fibras, e dar-lhes integridade e compacidade, eliminar saliências e melhorar a resistência à abrasão dos mesmos. O ideal é que cada fibra do fio apresente o caminho de uma espiral cilíndrica perfeita. Deve-se considerar a torção como um parâmetro determinante em muitas etapas do processo de beneficiamento, pois é um dos fatores que regula a penetrabilidade dos corantes e a sua difusão no interior das fibras no fio e no artigo têxtil (AGUIAR NETO, 1996; RHODIA-STER; MALUF e KOLBE, 2003).

RELAÇÃO COMPRIMENTO-LARGURA: considera-se como “relação comprimento-largura”, quando os materiais fibrosos, possui o comprimento (dimensão linear da fibra contínua) consideravelmente maior do que o diâmetro, numa razão mínima de 100, embora, a maioria das fibras apresentam uma relação muito maior. As fibras, especialmente as naturais, apresentam diâmetro irregular ao longo do comprimento. Essa finura ou diâmetro das fibras influencia as características funcionais de fios e tecidos. A indicação do título das fibras apresenta três formas usuais: (g/polegada, dado pelo aparelho Micronaire; dtex, g/10.000 m de fibras; den, g/9.000 m de fibras (GALHANI, 1993; AGUIAR NETO, 1996; MALUF e KOLBE, 2003).

TENACIDADE: é um termo usado para a resistência de fibras individuais. É definida, como a resistência à tensão expressa como a força por unidade de densidade linear (g/tex ou N/tex) de uma amostra. Quanto à resistência à tração de uma fibra depende do tipo de fibra, do processo de fabricação (fibras manufaturadas de tenacidade normal, média ou elevada), da espessura (ou diâmetro) e distância entre garras do dinamômetro (quanto menor a distância inicial entre as garras do dinamômetro maior a resistência da fibra, fio ou tecido, devido ao efeito do ponto fraco) (GALHANI, 1993; AGUIAR NETO, 1996; MALUF e KOLBE, 2003).

TÍTULO: do fio define a relação entre a massa do fio e seu comprimento (MALUF e

KOLBE, 2003).

UNIFORMIDADE: em fios e na construção de tecidos pode ser assegurada com mesclas de fardos, pois se consegue garantir similaridade no comprimento e na largura, na qualidade da fiação e na flexibilidade (AGUIAR NETO, 1996).

APÊNDICE

APÊNDICE A – Atividades remanescentes

Tabela A1. Atividade enzimática do caldo bruto centrifugado no pH corrigido com NaOH, denominado solução tampão NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Tipo de estabilizante	Sem		Glicerol		Sorbitol		Xilitol	
Tempo de incubação (h)	0	1	0	1	0	1	0	1
	109,95	76,93	112,19	64,60	104,81	54,65	112,13	83,06
Atividade enzimática (U)	111,96	76,51	110,31	61,80	111,47	49,91	108,67	87,05
	117,00	82,75	110,54	67,15	109,73	50,08	107,90	84,10

Tabela A2. Atividade enzimática do caldo bruto centrifugado na solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0.

Tipo de estabilizante	Sem		Glicerol		Sorbitol		Xilitol	
Tempo de incubação (h)	0	1	0	1	0	1	0	1
	190,67	81,68	181,95	127,54	186,33	178,96	202,48	143,94
Atividade enzimática (U)	185,27	78,36	179,88	125,36	191,60	178,96	194,18	150,58
	177,80	81,68	179,58	127,54	191,42	179,17	201,03	156,60

Tabela A3. Atividade enzimática do caldo bruto centrifugado no pH corrigido com a mistura carbonato-bicarbonato, denominado solução tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,0.

Tipo de estabilizante	Sem		Glicerol		Sorbitol		Xilitol	
Tempo de incubação (h)	0	1	0	1	0	1	0	1
	17,29	6,63	20,82	13,34	20,92	16,04	17,42	14,16
Atividade enzimática (U)	17,23	6,91	20,46	13,13	19,57	16,82	18,03	15,59
	18,47	6,24	19,42	12,72	20,04	16,00	19,26	15,65

Tabela A4. Atividade enzimática do caldo bruto centrifugado em água destilada, pH 6,0.

Tipo de estabilizante	Sem		Glicerol		Sorbitol		Xilitol	
Tempo de incubação (h)	0	1	0	1	0	1	0	1
	45,65	30,75	35,33	20,42	33,47	31,74	34,86	24,10
Atividade enzimática (U)	42,84	29,85	42,57	20,20	39,20	27,64	37,93	25,93
	46,49	30,90	38,14	21,61	40,21	29,91	43,33	26,80

Tabela A5. Atividade remanescente (%) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, na presença de 5 mM de agentes químicos.

CaCl ₂	MnSO ₄	MgSO ₄	ZnSO ₄	CuSO ₄	KCl	NaCl	(NH ₄) ₂ SO ₄	EDTA
73,30	69,03	25,16	12,41	2,17	100,65	106,81	125,77	63,35
74,19	69,13	26,82	12,06	2,29	99,42	101,78	126,83	61,76
73,77	69,47	34,37	12,63	2,75	104,23	105,63	127,72	61,55

* Atividade enzimática (U): 122,18; 124,68; 124,27.

Tabela A6. Atividade enzimática (U) do caldo bruto centrifugado em solução tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, com as condições estudadas segundo o planejamento experimental para os agentes tensoativos.

Condição	Umectante (g/L)	Emulsificante (g/L)	Tempo (min)			
			0	30	45	60
Ensaio I	1,0	1,0	72,64	47,46	29,83	24,35
			67,32	31,74	25,22	11,69
			71,64	39,41	23,65	17,24
Ensaio II	1,0	2,0	84,44	43,07	31,05	20,41
			73,18	37,37	24,37	18,21
			70,35	36,43	23,99	10,24
Ensaio III	5,0	1,0	73,23	45,23	28,60	23,26
			76,98	45,31	37,91	28,26
			70,36	40,04	33,74	18,07
Ensaio IV	5,0	2,0	78,94	45,36	43,82	36,24
			78,45	44,71	30,26	28,10
			73,10	39,88	35,42	24,66
Ensaio V	3,0	1,5	70,14	43,72	40,17	21,60
			71,49	46,38	40,13	21,81
			74,08	45,24	40,80	24,05

*Enzima utilizada para atividade enzimática de 75 U em solução tampão glicina-NaOH.

ANEXO

ANEXO A – Características das fibras e beneficiamento têxtil

A.1. FIBRAS

As fibras têxteis são elementos filiformes caracterizados pela flexibilidade, finura e grande comprimento em relação à dimensão transversal máxima (comprimento da ordem de 1.000 vezes o diâmetro), sendo aptas para aplicações têxteis. As fibras têxteis podem ter várias origens, que são usadas para sua classificação. As fibras são de origem natural de procedência animal, vegetal ou mineral e de origem não natural produzidas por processos industriais (sintéticas, inorgânicas e regeneradas) (AGUIAR NETO, 1996; ARAÚJO E MELO E CASTRO, 1986; MALUF e KOLBE, 2003).

A estrutura das fibras apresenta níveis de organização molecular que possuem relação estreita com certos aspectos do comportamento das fibras e das suas propriedades. O nível primário da estrutura molecular é definido pela composição química e estrutura molecular da unidade repetitiva, bem como da ligação polimérica. Essa estrutura está diretamente relacionada com as propriedades químicas, como a afinidade tintorial (corante fibra), hidrofiliidade, inchamento, e está indiretamente relacionado com todas as propriedades físicas. O nível de estrutura macromolecular está relacionado com o arranjo das cadeias de polímeros no espaço tridimensional, ou seja, com o comprimento das cadeias, distribuição de comprimento em regiões amorfas e cristalinas, rigidez, dimensão e forma da molécula. Nas fibras naturais, devem-se considerar outro nível de organização estrutural relacionado como o crescimento e desenvolvimento, advindo da morfologia complexa de fibrilas, microfibrilas e matrizes de configurações compostas (USSMAN e GUILLÉN, 2000).

A.1.1. Grau de Polimerização

As fibras têxteis são obtidas de muitas polimoléculas unidas. Essas polimoléculas são compostas por muitas unidades monoméricas, normalmente acima de 100, e muitas vezes, entre 200 a 15.000. Essas polimoléculas são resultantes da polimerização, que é uma reação química, na qual ocorre a repetição de uma unidade monomérica ou pela repetição de unidades compostas por dois ou três monômeros diferentes um número n de vezes em uma distribuição sistemática (AGUIAR NETO, 1996).

A descrição de um polímero, em parte, é pelo seu grau de polimerização, em português GP e inglês DP, de *Degree Polimerization*, sendo a primeira a nomenclatura que será adotada, o qual identifica o número de unidades moleculares ou monoméricas necessárias para formar uma poli ou macromolécula. O GP também influencia a resistência das fibras celulósicas, bem como pela distribuição molecular. Quanto maior o GP, mais resistente é a fibra (AGUIAR NETO, 1996). A Tabela A.1 apresenta o grau de polimerização em diferentes etapas de beneficiamento da fibra celulósica do algodão tipo *egípcio*.

Tabela A.1. Grau de polimerização (GP) em diferentes etapas de beneficiamento da fibra celulósica do algodão tipo *egípcio*.

Algodão Egípcio	GP
Purificado, não mercerizado	2.560
Mercerizado sem tensão	1.775
Mercerizado com tensão e seco ao ar	2.006
Mercerizado com tensão, seco a 100°C e lavado com sabão	2.056
Mercerizado por 60 minutos e lavado com sabão	2.210
Mercerizado por 120 minutos e lavado com sabão	1.206
Línter de algodão cru	~1.400
Línter de algodão alvejado	700

FONTE: MALUF e KOLBE, (2003) adaptado.

A.1.2. Propriedades das Fibras

As características das fibras influenciam a sua aplicação e a qualidade do produto final. As chamadas características ou propriedades essenciais, são compostas por: propriedades primárias e propriedades secundárias. As propriedades primárias incluem uma elevada relação comprimento-largura, tenacidade ou adequada resistência, flexibilidade ou maleabilidade, fiabilidade ou coesão e uniformidade. As propriedades secundárias visam à elevação do conforto e melhoria da manutenção, como forma física, densidade ou gravidade específica, brilho ou lustro, *regain*, alongamento, recuperação elástica (elasticidade), resiliência, comportamento térmico, resistência a microrganismos, resistência ao meio ambiente e à luz, resistência à abrasão, etc. Deve-se considerar que as propriedades secundárias variam de fibra para fibra (AGUIAR NETO, 1996).

A definição de cada propriedade, primária e secundária, é apresentada no glossário em anexo. Na Tabela A.2, são apresentadas quantitativamente algumas propriedades essenciais da fibra.

Tabela A.2. Características da fibra de algodão.

Característica		
Absorção de umidade		7-11
Retenção de água após centrifugação (5 minutos) (%)		40-50
Intumescimento	Extensão (%)	~0
	Secção (%)	20-25
Tenacidade (gf/tex)	Com.	20-25
	Úmido	22-28
Alongamento à ruptura (%)	Com.	7-9
	Úmido	10-12
Sensibilidade a agentes químicos	Ácidos	Decompõe-se em ácidos concentrados a frio e a quente.
	Álcalis	Intumesce em soda cáustica acima de 18°Bé (mercerização), com aumento do brilho e resistência.
	Oxidantes	Pouco sensível
	Enzimas	Pouco sensível
Sensibilidade	Ao calor	Amarela após 5 horas a 120°C; decompõe-se a 180°C; não funde, carboniza.
	À luz solar	Há elevada perda da resistência e amarelamento.

FONTE: RHODIA-STER; MALUF e KOLBE (2003).

A.1.3. Algodão

A fibra de algodão é do tipo fibrilar e com teor cristalino elevado, de 65 a 70%. Possui estrutura monocelular, composta por lúmen, parede primária e secundária, em forma de fita torcida sobre si mesma (circunvoluções). A fibra imatura apresenta parede delgada, a torção é pouco ou muito irregular e concentrada em curto segmento (RHODIA-STER).

Os diversos tipos de variedades de algodão distinguem-se, principalmente, pela altura da planta, finura e o comprimento das fibras. Conforme a variedade, o comprimento das fibras pode variar desde curtas, chamadas de línter, com 4 mm, até longas, com 60 mm. Todas

as espécies de algodoeiros selvagens e cultivados filiam-se ao gênero *Gossypium Linn*, que ocorrem selvagens nas regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios. Esse gênero compreende 20 espécies de plantas herbáceas, arbustivas e arborescentes, das quais apenas quatro são de valor comercial (MALUF e KOLBE, 2003):

- *Gossypium barbadense Linn*: são espécies de crescimento anual e perene ou arbóreo. Produz os algodões comerciais conhecidos por *egípcios*, de fibra longa e fina.

- *Gossypium hirsutum Linn*: é uma espécie herbácea, conhecida pela designação *Upland*. Produz uma fibra de comprimento e finura bastante variável, que geralmente é intermediária entre aquela dos algodões *asiáticos* e *egípcios*.

- *Gossypium herbaceum Linn* e *Gossypium arboreum*: produzem algodões comerciais denominados *indianos* ou *asiáticos*, que se caracterizam pelas fibras curtas e grossas.

Como a composição das fibras de algodão varia conforme a maturidade, a seguir será descrito o desenvolvimento da fibra de algodão em cada fase. A partir da etapa de florescimento até a formação da fibra de algodão madura, são necessários aproximadamente 90 dias. No florescimento da planta *Gossypium*, células individuais na epiderme das sementes que estão contidos no capulho começam a crescer na direção longitudinal até seu comprimento ter aumentado cerca de mil vezes. Estas células consistem essencialmente de seiva envolvida por uma membrana ou cutícula contendo pectina, proteína e cera. Esta membrana desenvolve internamente uma fina camada de celulose, para formar a parede primária da fibra. A parede primária é responsável pela falta de umectabilidade da fibra não preparada. Esta fase de desenvolvimento dura aproximadamente 20 dias. Após a fibra ter crescido até seu comprimento final, ocorre a formação de uma segunda parede, chamada de parede secundária, que engrossa rapidamente por depósito de celulose em camadas concêntricas até sua maturidade, da parte externa para a interna. Ao atingir a maturidade há uma cavidade central ou lúmen cheio de protoplasma, que ocupa cerca de um terço da secção transversal da fibra. Durante esta fase que dura entre 35 a 50 dias, diminui o teor de pectina e aumenta o teor de cera; acompanhado por um aumento de sua resistência longitudinal. A deposição de celulose na parte interna da fibra não é uniforme e varia não só para as fibras de sementes diferentes, como também entre fibras de mesma semente e fibras de mesmas células ao longo de seu comprimento. Quando o capulho abre, ocorre o colapso da fibra, ou seja, começa a secar e perde a forma cilíndrica e fica espalmada, torcendo-se sobre o seu próprio eixo, adquirindo assim a sua imagem microscópica típica. A cavidade interna contém resíduos do protoplasma, ou seja, proteínas, sais minerais e corantes naturais como clorofila, xantofila e caroteno (ARAÚJO E MELO e CASTRO, 1986, HOONDAL *et al.*, 2002, MALUF e KOLBE, 2003).

Quimicamente, as fibras de algodão, são constituídas por celulose pura, contendo pequena porcentagem de impurezas, na sua maioria essas estão 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 absorvência de água e alvura das fibras de algodão (ARAÚJO E MELO e CASTRO, 1986; HOONDAL *et al.*, 2002; PACHECO, 2004). A Tabela A.3 apresenta a composição da parede primária com cutícula e a fibra como um todo. A variação na composição do algodão em função da maturidade é apresentada na Tabela A.4. A Figura A.1 apresenta o esquema e corte transversal da fibra de algodão.

Tabela A.3. Composição percentual da fibra (total) e da parede primária com cutícula do algodão.

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

Nota: (a) ácidos poligalacturônicos e seus sais de Ca, Mg ou Fe; (b) álcoois graxos (C24–C30), ácidos graxos, seus ésteres (colesterol), carboidratos; (c) ácidos poliaminocarboxílicos; (d) fosfatos e carbonatos de Ca, Mg, K e Na; (e) oligômeros, ácidos orgânicos. FONTE: MALUF e KOLBE, 2003.

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 (purga - algodão ou maceração - linho e juta - e alvejamento). As fibras animais dependem de fatores genéticos (diferentes raças), climáticos e solo (alimentação), saúde e beneficiamento. Quanto à fibra de origem mineral (amianto crisotila) seriam: o solo e as condições climáticas.

Os produtos gerados pela hidrólise do algodão, segundo análises cromatográficas, são ácidos glutâmico e aspártico, leucinina, valina, alanina e, possivelmente, serina e arginina.

Porém é verificada a presença de outros aminoácidos não identificados no cromatograma (AGUIAR NETO, 1996).

A Tabela A.5 apresentada o efeito de extração de constituintes da fibra de algodão, quando se emprega algum solvente, geralmente utilizado, nas etapas a úmido do processo de beneficiamento.

Tabela A.4. Composição do algodão em função da maturidade.

Dias após a floração	Teor (%)				
	Celulose	Umidade	Cinza	Ceras	Nitrogênio
20	81,00	7,80	3,08	1,50	0,64
30	88,10	6,30	2,20	0,90	0,38
40	89,20	5,90	2,06	0,90	0,17
50	92,60	6,20	1,76	0,72	0,15
60	94,20	5,50	1,14	0,60	0,15
Fibras maduras	94,50	5,50	1,14	0,63	0,15

FONTE: MALUF e KOLBE, 2003.

A.1.3.1. Celulose

A celulose é um carboidrato, presente nas fibras de algodão, consiste de resíduos D-glucose unidos por ligações β -(1,4)-glicosídicas formando cadeias lineares de polímeros de mais de 10.000 resíduos de glucose. As moléculas de celulose paralelas e adjacentes estão interligadas, por meio de ligações de hidrogênio, conferindo às fibras de algodão grande resistência à tração e estabilidade dimensional. A presença de elevado número de grupos hidróxidos é responsável por algumas das propriedades do algodão, como a grande capacidade para absorver água (cerca de 50% do seu massa) e a facilidade de tingimento, assim como de lavagem em meio aquoso. Se as fibras de algodão forem adequadamente processadas, a degradação da celulose é praticamente nula (ARAÚJO E MELO e CASTRO, 1986; AGUIAR NETO, 1996; DA-SILVA *et al.*, 1997; TEERI, 1997).

As fibras de celulose são formadas por regiões cristalinas, porção resistente, e amorfas, porção hidrolisável por enzimas. A celulose misturada com emulsão enzimática sofre quebra nas ligações β -glucose e gera celobiose (composta por duas unidades glicosídicas). Isto indica que as unidades de glucose possuem configuração β , portanto, as ligações entre os grupos hidroxila nas posições 1:4, gira cada unidade em um ângulo de 180°. Assim, os grupos -OH para o mesmo lado do plano da configuração molecular, e por isso

adjacente para cada outra configuração (TROTMAN, 1984; DA-SILVA *et al.*, 1997). A Figura A.2(a) apresenta a configuração β -glicose e a Figura A.2(b) a estrutura da celulose.

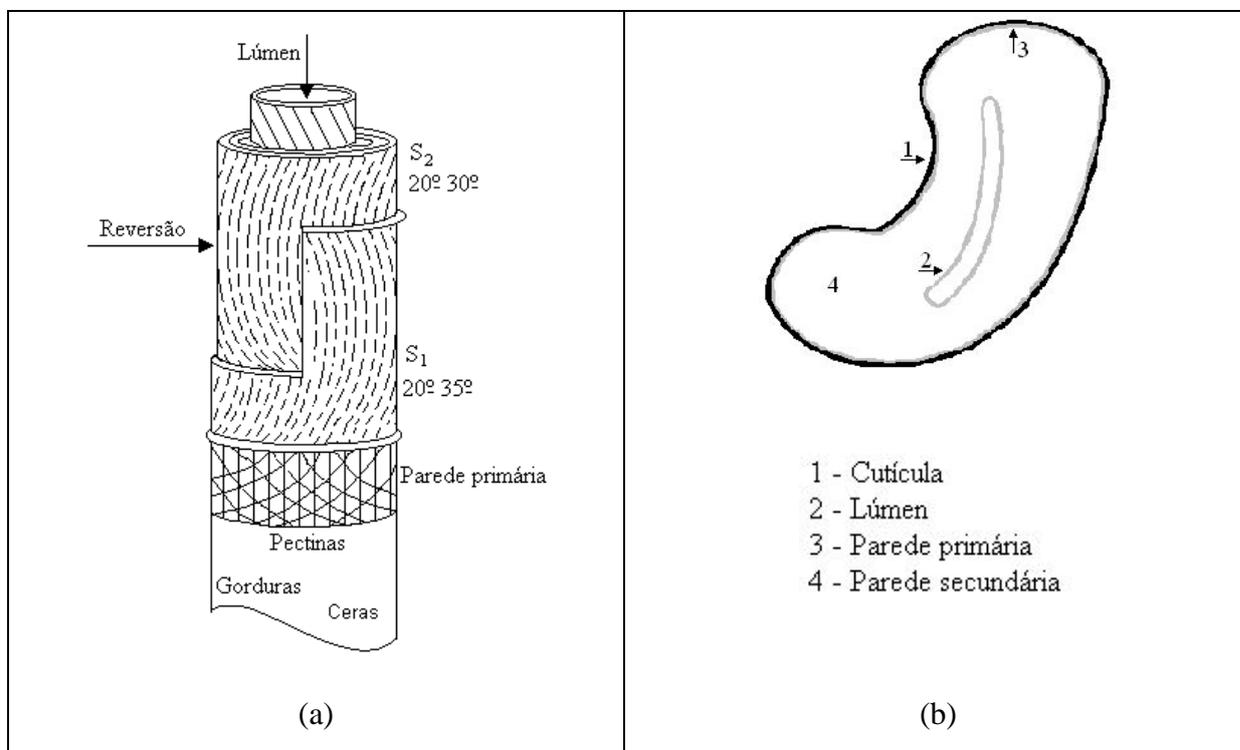


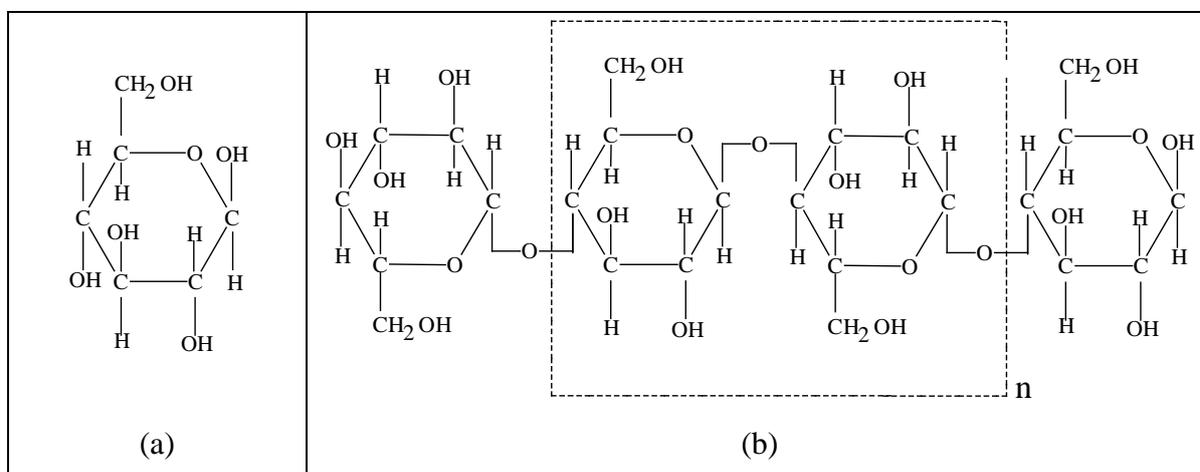
Figura A.1. Vista esquemática (a) e corte transversal (b) da fibra de algodão. FONTE: AGUIAR NETO, 1996.

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. A celulose nativa ou celulose I demonstra um padrão de difração que é reconhecidamente diferente das formas cristalinas das celuloses II, III e IV produzidas artificialmente (*man-made*), conhecidas como, que também demonstram padrões distintos. O principal ponto de interesse relacionado ao polimorfismo surgiu da observação que a celulose I ocorre apenas como produto natural, resultado de biosíntese. Uma vez que tenha sido mercerizada ou solubilizada ou regenerada, a transformação (para celulose II) permanece irreversível. A celulose I é típica das estruturas de cadeias paralelas, e a celulose II é típica de estruturas de cadeias antiparalelas (YOUNG e ROWELL, 1986, DA-SILVA *et al.*, 1997). A Tabela A.6 apresenta o conteúdo de celulose presente em plantas. Verifica-se que o algodão apresenta a maior porcentagem.

Tabela A.5. Efeito da extração de algodão cru com vários solventes.

Solvente	Ação sobre matéria contida no algodão cru.		
	Extraível	Não extraível	Extrato total (%)
Água	84% de cinza; sais de potássio; sais de sódio; fosfato; açúcares	Cera; 70-90% de proteínas; pectina; sais de cálcio, ferro e alumínio	2,5
Álcool etílico 95% (a quente)	Cera; açúcares 25% de cinza	Proteína; pectina	-
Clorofórmio, benzeno, solventes imiscíveis com água	Cera	Proteína; pectina; cinza	0,6
Ácidos 0,1 N (a frio)	97% de cinza; açúcares	Cera; 65-85% de proteína	2,7
Citrato ou oxalato de amônio (a quente)	Pectinas; açúcares	Cera	-
NaOH diluído (a fervura)	90% de cinza; 90% de proteína; 69% de cera; 100% de pectina; açúcares	-	-

FONTE: MALUF e KOLBE, 2003.

**Figura A.2** (a) β -glicose (b) Fórmula estrutural da celulose. FONTE: TROTMAN, 1984.**Tabela A.6.** Conteúdo de celulose de plantas.

Planta	% Celulose	Planta	% Celulose
Algodão	95-99	Casca	20-30
Ramie	80-90	Musgo	25-30
Madeira	40-50	Alga marrom e vermelha	1-10

FONTE: YOUNG E ROWELL, 1986.

Sob a ação da luz, a celulose é oxidada pelo oxigênio atmosférico formando-se oxixelulose, reduzindo a resistência à tração e da viscosidade da fibra, e um aumento no número de cobre e iodo da celulose que a compõe. Essa fotoxidação da celulose depende do comprimento de onda da luz (sendo que o raio ultravioleta são os mais ativos), da umidade e temperatura do meio ambiente, da estrutura do material (tecidos pesados são mais resistentes que tecidos leves) e por diferentes impurezas contidas no ar e no tecido. Para o algodão, verifica-se que a resistência à luz é maior no tecido cru que no alvejado (MALUF e KOLBE, 2003).

O grupo hidroxila (OH) da celulose, sendo esta modificação na estrutura química mais favorável à aplicação de corantes e acabamentos. A substituição ocorre quando um ou mais grupos hidroxila são removidos e outros íons ou radicais (átomos ou grupos de átomos) atacam o átomo de carbono no lugar do grupo hidroxila. A remoção do radical hidroxila pode também resultar na formação de *crosslinking* (ligações cruzadas) das moléculas de celulose, o que ajuda na formação de fibras de celulose, que são altamente resistentes à dobra e dela se recuperam facilmente (AGUIAR NETO, 1996).

A.1.3.2. Ceras

As ceras estão localizadas na superfície da fibra de algodão. Agem como um agente lubrificante e conferem hidrofobicidade às fibras. Por isso, as ceras, são consideradas o maior obstáculo para a umectação das fibras, apesar de não ter sido encontrado correlação entre a absorção aquosa da fibra de algodão e seu conteúdo natural de ceras. A remoção das ceras das fibras dificulta a fiação adequada do algodão, pois o coeficiente de atrito triplica quando a cera é removida (RHODIA-STER, PACHECO, 2004).

As ceras constituem entre 0,4-1,2% da massa do algodão. São difíceis de serem removidas, pois são substâncias muito complexas, compostas por um ou mais álcoois de alta massa molecular e ácidos graxos livres ou esterificados. Acredita-se que estes estejam ligados quimicamente à celulose ou pectina, ou alternativamente a proteínas residuais (PACHECO, 2004).

A.1.3.2. Substâncias Pécnicas

As substâncias pécnicas são formadas por duas frações interligadas: a ramnogalacturonana e a homogalacturonana. A ramnogalacturonana é um heteropolímero que

tem a sua estrutura principal formada por repetidas unidades de ácido galacturônico ligado à ramnose e cadeias laterais consistindo de arabinose e galactose e não interagem com cálcio. A homogalacturonana é um polímero formado por unidades de ácido galacturônico e/ou o seu metil éster unidos por ligações glicosídicas $\beta(1,4)$, com importância tecnológica, devido à sua capacidade de ligar cálcio, aumentar a viscosidade e formar gel (DA-SILVA *et al.*, 1997)

As substâncias pécnicas estão localizadas principalmente entre a lamela e a parede primária. Consistem principalmente de heteropolissacarídeos, ácidos e neutros, com diferentes massas moleculares e grau de esterificação. A cadeia central possui resíduos de ácido galacturônico ligados por ligações $\beta(1,4)$ -glicosídicas. As cadeias laterais da molécula de pectina consistem de L-raminose, arabinose, galactose e xilose. Os grupos carboxila do ácido galacturônico são parcialmente esterificados pelos grupos metila e parcialmente ou completamente neutralizado pelos íons sódio, potássio, ou amônio. Assim, conforme o tipo de modificações na cadeia central, as substâncias pécnicas são classificadas em protopectina, ácidos pécnicos, ácidos pectínicos e pectina. As protopectinas são insolúveis em água enquanto às outras três substâncias pécnicas são parcialmente ou totalmente solúveis em água. As pectinas são ácidos poligalacturônicos (galacturonanas) totalmente ou parcialmente esterificados. As protopectinas são substâncias pécnicas ligadas a outros componentes da parede celular. Os ácidos pécnicos são formados de ácidos poligalacturônicos não esterificados. Associadas com íons de cálcio, magnésio ou ferro, as substâncias pécnicas dificilmente são removidas por meios convencionais (BUSCHLE-DILLER, 2001b, KASHYAP *et al.*, 2001, ALKORTA *et al.*, 1998). A estrutura da molécula de pectina é apresentada na Figura A.3.

Os sais de pectina insolúveis em água servem para juntar as ceras e proteínas para formar a barreira de proteção da fibra. A quantidade e composição desta barreira variam com as condições de crescimento, fatores climáticos e variedade do algodão (HOONDAL *et al.*, 2002).

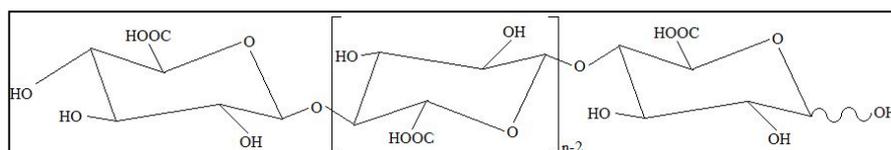


Figura A.3. Estrutura da molécula de pectina. FONTE: CHUNG *et al.*, (2004).

O residual de pectina no tecido pode ser analisado pelo tingimento com o corante Ruthenium Red, pois esse tingem apenas substâncias pécnicas e protéicas na fibra de algodão.

Resumidamente, segundo Lenting *et al.*, (2002), duas amostras são costuradas junto com um tecido cinza (funciona como controle, 100% pectina), e o tecido alvejado e purgado – alcalinamente (funciona como controle, 0% de pectina) em formato circular com um diâmetro de 8 cm. Esta amostra é tratada com Ruthenium Red (0,2 g/L e 100 mL/g na presença de dois surfactantes (Silet L-77 e Tergitol 15-S-12) com concentração de 1 g/L, durante 15 minutos numa sala climatizada, então a amostra é lavada durante 10 minutos a 60°C. Após é medida a refletância a 540 nm e o valor de K/S é calculado pela equação conhecida como Kubelka Munk. Destes valores, é determinado o percentual residual de pectina. A equação A.1 conhecida como Kubelka Munk:

$$K/S = (1-R)^2/2R^* \quad (\text{A.1})$$

onde:

K = coeficiente de absorção;

R^* = refletância da amostra tingida no comprimento de onda de máxima absorção;

S = coeficiente de dispersão.

A.1.3.4. Minerais e Metais

A natureza e quantidade do material mineral encontrado no algodão dependem da composição do solo. Sendo que a exata natureza e proporção dos sais podem variar significativamente (TROTMAN, 1984).

Quanto aos metais, como os alcalinos terrosos, cálcio (Ca^{+2}) e o magnésio (Mg^{+2}) podem ser encontrados em quantidades apreciáveis nas fibras de algodão, até 2.500 ppm de Ca^{+2} e 700 ppm de Mg^{+2} . O ferro (Fe^{+2}) também é frequentemente encontrado nas fibras de algodão, em quantidades expressivas, atingindo 60-70 ppm de Fe^{+2} . Esses metais têm diversos efeitos negativos sobre o tingimento, sendo a complexação dos corantes um dos piores, pelas consequências negativas na igualização, nuance da cor e às vezes nos índices de solidez a fricção. Particularmente o ferro, além da corrosão dos equipamentos, causa a degradação da fibra de algodão nos processos de alvejamento químico (RHODIA-STER).

A.1.3.5. Cinzas

As cinzas do algodão contêm ácido silícico, carbonatos de potássio, cálcio, magnésio e manganês, cloretos, sulfatos e fosfatos, óxidos de ferro e alumínio, sais de potássio e sódio, que formam cerca de 95% do total das cinzas. Os índices de cinzas diminuem com a maturidade da fibra, ao mesmo tempo em que muda a sua composição (AGUIAR NETO, 1996). Na Tabela A.7 são apresentadas às variações médias de metais e sais presentes nas cinzas do algodão.

A.2. FIOS

Segundo Maluf e Kolbe, (2003), fio é um termo genérico para uma mecha contínua de fibras têxteis, filamentos ou outro material em forma adequada para a tecelagem, malharia ou outra forma de entrelaçamento, para formação de um tecido. Os fios podem ser caracterizados pela umidade, título, fiabilidade, torção (necessária para produção de fios de fibras e conferir integridade e compacidade, eliminar saliências e melhorar a resistência à abrasão dos mesmos), resistência à tração (carga e alongamento de ruptura), irregularidade e imperfeições, defeitos pouco frequentes e pilosidade.

Tabela A.7. Variações médias dos componentes das cinzas de algodão.

Material	Massa (%)	Material	Massa (%)
Al ³⁺	2 – 4	Si ³⁺	1 – 5
Ca ²⁺	5 – 10	Na ¹⁺	3 – 8
Cl ¹⁻	3 – 10	SO ₄ ²⁻	5 – 15
Cu ²⁺ ou Cu ³⁺	Traços	Mg ²⁺	5 – 10
Fe ²⁺ ou Fe ³⁺	1 – 3	Mn ³⁺	Traços
PO ₄ ³⁻	3 – 5	CO ₃ ²⁻	10 – 20
K ¹⁺	20 – 40	-	-

FONTE: MALUF e KOLBE, 2003.

A.3. TECIDOS

Os tecidos podem ser classificados, conforme a forma do entrelaçamento dos fios que compõem o tecido, como planos ou malhas (tubulares ou planas). O tecido, na tecelagem de malhas, é formado pelo entrelaçamento de um ou mais conjuntos de fios através de um conjunto de laçadas, não formando ângulos ortogonais ente si, como ocorrem nos tecidos

planos (LEÃO *et al.*, 2002).

Segundo Maluf e Kolbe (2003), os tecidos quando saem da tecelagem ou malharia não possuem boa aparência e toque para uso, por isso precisam ser beneficiados para se tornarem mais apresentáveis e aumentarem seu valor agregado. Estes processos de beneficiamento podem ser divididos em: pré-tratamento ou beneficiamento primário; beneficiamento secundário e acabamento ou beneficiamento final.

O tratamento químico das fibras de algodão, realizado a úmido, visa basicamente à remoção de cor e de substâncias que causam hidrofobicidade, para aumentar a alvura e absorvência (umectibilidade). Nas diversas etapas que compõem o processo de beneficiamento de artigos têxteis de algodão, como: desengomagem, purga ou cozimento, alvejamento, tingimento e acabamento, são usados vários tipos de insumos químicos, que além de causarem danos as fibras também contribuem na carga poluente dos efluentes (ALY *et al.*, 2004).

A.3.1. Beneficiamento

A.3.1.1. Pré-Tratamento

O pré-tratamento é uma etapa do processo de beneficiamento têxtil que envolve a chamuscagem, desengomagem, purga, alvejamento, mercerização, aplicação do alvejante ótico e termofixação. É nesta fase de processamento do algodão (processo de chamuscagem, ausência de relaxamento da fibra durante as várias fases dos processamentos de pré-tratamento, os processos de desengomagem deficientes, a baixa absorção das fibras, a geração de rugas e vincos, trechos que sofrem excessiva abrasão, elevada perda do grau de polimerização da fibra, grau de branco insuficiente, etc.) que acontecem os danos mais graves à fibra de algodão, os quais influenciarão definitivamente os resultados finais dos acabamentos a serem executados (CIBA, 1994; MALUF e KOLBE, 2003).

A chamuscagem é um processo que visa eliminar mediante a queima a penugem superficial existente em fios e tecidos. A velocidade da passagem do tecido pelas chamas deve ser capaz de eliminar as fibras finas salientes sem deteriorar o tecido (MALUF e KOLBE, 2003).

A desengomagem é a eliminação de goma dos fios singelos de urdume de algodão que são engomados para melhorar o desempenho nas operações de tecelagem (atrimento). As principais gomas utilizadas são: amidos naturais (batata, arroz, maisena, mandioca, milho);

amidos modificados (ésteres e éteres de amidos, como as dextrinas); polímeros sintéticos (acrilatos, álcoois polivinílicos, etc.); outros derivados celulósicos (carboximetilcelulose, hidroxietilcelulose, etc.); gelatinas e polímeros solúveis em solventes orgânicos. Para os fios de algodão 100%, são utilizados os amidos e as dextrinas, pois são baratos e apresentam bom desempenho na tecelagem. A desengomagem pode ter maior ou menor dificuldade dependendo de fatores como: umectação, absorção da solução (*pick-up*), tempo de repouso, intumescimento, solubilização e lavagem da goma; capacidade de redissolução da goma nos fios; teor de goma dos fios; natureza dos agentes lubrificantes; características construtivas do tecido como número de fios e batidas, padronagem, título e torção dos fios, etc.; processo de desengomagem (enzimática, alcalina ou ainda alcalina oxidativa) (RHODIA-STER).

A purga ou descruide ou cozimento alcalino (especialmente tecidos de malhas de algodão, que não sofrem engomagem) é a eliminação de material não celulósico da superfície da fibra de algodão, para conferir à fibra maior umectabilidade (absorção de água) e a alvura dos materiais têxteis, que é o principal objetivo no processo de preparação do algodão. A remoção industrial mais comum das substâncias não-celulósicas (lipídeos, ceras, substâncias pécnicas, ácidos orgânicos, proteínas, etc.) é efetuada convencionalmente pelo tratamento com hidróxido de sódio. Geralmente a purga alcalina é realizada com uma solução diluída de hidróxido de sódio (1 a 4%) durante 30 a 60 minutos, sob condições atmosféricas ou pressão. A maioria das purgas ocorre sob condições atmosféricas e a temperatura entre 75-100°C. Quando realizado sob pressão, a temperatura atinge entre 125-130°C. Remove a hemicelulose e os produtos existentes na parede primária, como pectinas, ceras e proteínas, saponificados ou degradados até sua solubilidade em água, emulsionados e dispersos. O rigoroso pH e temperatura requeridos para a purga são danosos para muitas fibras. Apesar da purga alcalina ser efetiva e o custo do hidróxido de sódio ser baixo, o processo é caro porque consome grandes quantidades de energia, água e agentes auxiliares. A eficiência do processo de purga está diretamente relacionado ao sucesso das operações de processamento úmido subsequentes: alvejamento, tingimento, mercerização e acabamento. A fibra purgada apresenta-se limpa, razoavelmente branca, com capacidade absorvente e possibilidade de dano oxidativo (TZANOV *et al.*, 2001; PACHECO, 2001; AXT-MARTINELLI, 2002; MALUF e KOLBE, 2003; KARAPINAR e SARIISIK, 2004).

As condições do descruide alcalino devem ser estritamente controladas, pois podem ocasionar inúmeros inconvenientes, como a oxidação da celulose devido à exposição ao ar durante o tratamento alcalino; mercerização das fibras de algodão causada pelas soluções concentradas de álcali; precipitados na superfície do tecido, causados pela combinação dos

íons cálcio e magnésio com as moléculas do banho, devido à ausência de sequestrantes. Esses inconvenientes causarão problemas nos processos de tingimento, estamparia e acabamento (PACHECO, 2001).

O alvejamento visa à remoção completa das cascas das sementes; extração de impurezas coloridas de tipo indeterminado, causadas pelas condições de crescimento; hidrólise, oxidação e remoção de goma residual; obtenção do grau de alvura necessário, com o mínimo possível de degradação das fibras; e melhoria da absorvência do tecido e sua uniformidade. Considerando as vantagens técnicas de alguns agentes alvejantes, como utilização em processo a frio e a quente, prefere-se geralmente o peróxido de hidrogênio, pois, seu efeito de alvura apresenta solidez à luz (MALUF e KOLBE, 2003).

A mercerização confere encolhimentos de 20-30% e aumento de propriedades como: brilho; resistência à tração; afinidade tintorial; maciez; hidrofiliidade e melhoria da uniformidade tintorial e da estabilidade dimensional. Estas características são alcançadas quando se trata um fio ou tecido de algodão, tecido plano ou de malha com uma solução de hidróxido de sódio de 28 a 33°Bé (22 a 26%, ou 267,4 a 344,7 g/L de NaOH), pois causa a modificação da estrutura interna da fibra, pelo intumescimento de até 15% no diâmetro, 12% de encolhimento no comprimento e a uma melhor orientação das regiões cristalinas no sentido de seu eixo. A seção transversal ovalada inicial da fibra passa a ser circular, o lúmen quase desaparece e a torção de convolução também desaparece (MALUF e KOLBE, 2003).

Os alvejantes ópticos são substâncias incolores que agem semelhantemente aos corantes, tendo certa reatividade com as fibras, as quais são aplicadas, para aumentar o grau de alvura. O uso de agentes de alvejamento óptico melhora a alvura dos têxteis, até um valor máximo, depois ocorre à diminuição, ou seja, à medida que aumenta o teor do alvejante óptico sobre o tecido, aumenta a alvura, até se atingir um valor máximo. A partir deste, a adição de alvejante produz a diminuição da alvura, pois provoca um acúmulo do alvejante no substrato, resultando num deslocamento da emissão para comprimentos de onda maiores. A natureza química da fibra deve ser considerada quando se escolhe os alvejantes, bem como a presença de sais e aditivos sobre o substrato, pois podem influenciar o efeito do alvejante óptico (MALUF e KOLBE, 2003).

A.3.1.2. Beneficiamento Secundário

O beneficiamento secundário é composto pelas etapas de tingimento e estampagem, e objetiva tornar os tecidos mais atrativos e úteis.

O tingimento confere cor aos tecidos, que devem possuir boa solidez à lavagem, à luz e à fricção. O caráter iônico das fibras influencia fortemente seu tingimento. Se as cadeias do polímero nas fibras tiverem ou serem induzidas a ter cargas iônicas, por meio da seleção adequada das condições do banho de tingimento, elas serão potencialmente capazes de interagir com cargas opostas de íons coloridos (MALUF e KOLBE, 2003).

A estampagem consiste na aplicação pasta de estampagem colorida nos substratos têxteis, com pigmentos insolúveis em água e principalmente no caso de pigmentos que não possuam afinidade pela fibra, formando figuras localizadas, que se repetem, formando uma padronagem. Esta pasta deve ser absorvida superficialmente, sem se espalhar demais para o interior do tecido e para áreas adjacentes, não estampadas. Devendo permanecer no local de sua aplicação até o momento em que o tecido é seco (MALUF e KOLBE, 2003).

A.3.1.3. Acabamento

O acabamento ou beneficiamento terciário consiste de alguns tratamentos finais para deixar os tecidos prontos para o mercado, como recuperar efeitos perdidos e conferir novos efeitos artificiais (CLARIANT, 2001).

Os acabamentos especiais, para aumentar sua durabilidade, conforto, atratividade estética e para facilitar a lavagem. Existem diversas maneiras de se classificar o acabamento, como: permanentes (duráveis) ou temporários (renováveis); decorativos ou funcionais; ou químicos ou mecânicos. Estes acabamentos visam contribuir com a durabilidade; conforto; *easy-care* (facilidade de cuidado) e melhoria estética (MALUF e KOLBE, 2003).

A.3.1.3.1. Estonagem

O processo de desbotamento conhecido como *stonewash* ou estonagem tem como objetivo ocasionar a descoloração desigual de um artigo confeccionado, geralmente algodão, tingido com corantes sulfurosos, reativos ou índigo artigo, para lhe conferir o aspecto de usado. O processo de desbotamento consiste em submeter o artigo à ação erosiva de pedra pomes e um agente oxidante, geralmente permanganato de potássio, em uma lavadora (CEGARA, 2000).

Segundo Andraus (2001), para a lavagem de 1 kg de tecido é necessário aproximadamente 1 kg de pedra pomes. Dentre as numerosas desvantagens da utilização de pedras na lavagem tem-se: desgaste de aproximadamente 50% da pedra; desgaste rápido e

ruptura das máquinas de lavar, centrífugas e secadeiras, devido à migração de fragmentos de pedras; irregularidade no tamanho e na qualidade das pedras; excessiva abrasão do artigo, piorando sua qualidade; problemas ambientais devido à geração de efluentes não biodegradáveis; condições de trabalho insalubre, decorrente da poeira das pedras e ruído das máquinas; tempo de processo prolongado em virtude da necessidade de remoção das pedras dos bolsos dos artigos acabados.

ANEXO B – Material e métodos para produção do caldo bruto centrifugado de *Bacillus pumilus* CBMAI 0008

B.1. MATERIAL

B.1.1. Microrganismo

A bactéria *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 foi isolada de material vegetal em decomposição em um estudo prévio (DUARTE et al., 1997).

B.1. 2. Meios de Cultura

B. 1. 2. 1. Meio para Manutenção da Bactéria

O meio de xilana de bétula, de acordo com Mandels e Stenberg (1976), com os nutrientes necessários para a manutenção da bactéria durante o cultivo é apresentado na Tabela B.1. O pH foi acertado para 9,0 com NaOH 2N, e o meio esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 min.

Tabela B.1. Nutrientes utilizados para manutenção da bactéria durante o cultivo.

Nutriente	Quantidade (g/L)	Nutriente	Solução (mg/L)
Xilana de bétula	10	FeSO ₄ .7H ₂ O	5,0
Peptona	1,0	MnSO ₄ .H ₂ O	1,6
Tween 80	1,0	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,4
Ureia	0,3	CoCL ₂	2,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4	Ágar-ágar	20
KH ₂ PO ₄	2,0	-	-
CaCl ₂	0,3	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3	-	-

* *birchwood* – Sigma.

B. 1. 2. 2. Meio para Produção de Enzimas Xilanolíticas

Meio de xilana líquido, de acordo com Mandels e Stenberg (1976), citado acima, com concentração otimizada de xilana e peptona, de acordo com Duarte *et al.* (1999).

B. 1. 3. Reagentes

Todos os reagentes utilizados possuem grau analítico, com exceção da xilana de bétula (birchwood - Sigma X-0502).

B. 2. MÉTODOS

B. 2. 1. Métodos de Cultivo

B.2.1.1. Preservação e Manutenção de *B. pumilus* CBMAI 0008

A bactéria foi preservada em meio sólido inclinado contendo xilana de bétula. A manutenção das culturas foi feita por repicagem periódica no meio, seguido de incubação a 45°C até crescimento, e de estocagem sob refrigeração a 5°C. Réplicas das culturas foram preservadas em óleo mineral e em criotubos com glicerol.

B.2.1.2. Padronização de Inóculo

Para preparo de inóculo, células do meio de preservação foram transferidas para frasco de Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL do meio de xilana de bétula líquido. Após 20 horas de incubação a 45°C e 250 rpm, a densidade óptica da cultura foi ajustada para $T_{600} = 3\%$ a 600 nm, com água destilada esterilizada. Este procedimento foi conduzido com objetivo de padronizar o inóculo referente a diferentes fermentações para produção da enzima.

B.2.1.3. Obtenção de Enzimas Xilanolíticas

Para produção de xilanases foi utilizado o meio de Mandels e Stenberg (1976), contendo 1% de xilana de bétula e 0,6% de peptona (pH 9,0). O inóculo, preparado conforme descrito acima, foi utilizado na proporção de 20% (v/v). A fermentação foi conduzida em

frascos de Erlenmeyer com capacidade para 250 mL, contendo 50 mL de meio, sob agitação à 250 rpm e temperatura de 45°C durante cerca de 18 horas. O extrato enzimático bruto obtido foi centrifugado a 10.000 rpm sob refrigeração a 5°C, para separação das células bacterianas e pré-clarificação do material. Uma amostra foi armazenada a -25°C para determinação da atividade enzimática no extrato bruto, ou liofilizada. Outra parte do material foi submetida ao processo de purificação e concentração, conforme indicado no item 5.2.3.