



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

ALINE PIMENTEL

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA PECTINASE COMERCIAL E
SUA UTILIZAÇÃO NO PROCESSO DE PURGA DA INDÚSTRIA
TÊXTIL**

Florianópolis, Junho de 2010



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

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA PECTINASE COMERCIAL E
SUA UTILIZAÇÃO NO PROCESSO DE PURGA DA INDÚSTRIA
TÊXTIL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina com requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

ALINE PIMENTEL

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.
Coorientador: Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza

Florianópolis, Junho de 2010.

CARACTERIZAÇÃO DE UMA PECTINASE COMERCIAL E SUA UTILIZAÇÃO NO PROCESSO DE PURGA DA INDÚSTRIA TÊXTIL

ALINE PIMENTEL

Dissertação de mestrado submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Química

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.
Orientador e Presidente da Banca

Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza
Coorientador

Prof. Dr. Carlos Henrique Lemos Soares
CCB – UFSC

Prof. Dr. Jürgen Andreas
Departamento de Química - FURB

Florianópolis, Junho de 2010.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Janete e Wilton, pelo amor, confiança, compreensão e por toda ajuda, permitindo que eu dedicasse grande parte do meu tempo a este trabalho, fazendo tudo o que estava a seus alcances por mim.

Ao meu amor Leonardo, por todo o carinho, companheirismo e por me incentivar em todos os momentos.

Amo vocês

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais esta etapa vencida, pelos momentos difíceis enfrentados neste período, por estar sempre comigo me dando força e sabedoria.

Aos meus pais, pela motivação e carinho.

Ao meu namorado, pelo amor e confiança. Pela tranquilidade que me transmite, fazendo com que eu esquecesse dos problemas.

Ao professor Agenor, pela orientação, paciência ao ensinar, confiança e amizade. Por ter sido um orientador presente, sempre disposto a ensinar.

Ao professor Antônio Augusto também pela orientação, confiança e apoio, disponibilizando tudo o que precisei também em seu laboratório de pesquisa.

A todos os colegas do ENGEBIO e LABMASSA pela cooperação no laboratório e pelos momentos de descontração. Em especial à Juçara Hobold por toda ajuda, em todos os momentos, por ser sempre tão prestativa, espontânea e amiga.

Ao Edevilson, secretário da pós-graduação em Engenharia Química, excelente profissional, prestativo e amigo, uma pessoa muito querida.

Aos membros da banca, por aceitarem avaliar este trabalho, contribuindo com suas sugestões.

À UFSC, e CAPES pelo suporte e apoio financeiro.

À Novozymes pela doação das enzimas.

A Ciência e Deus

Um senhor de 70 anos viajava de trem tendo ao seu lado um jovem universitário, que lia o seu livro de ciências. O senhor, por sua vez, lia um livro de capa preta. Foi quando o jovem percebeu que se tratava da Bíblia, e que estava aberta no livro de Marcos. Sem muita cerimônia o jovem interrompeu a leitura do velho e perguntou:

- O senhor ainda acredita neste livro cheio de fábulas e crendices?

- Sim, mas não é um livro de crendices. É a Palavra de Deus. Estou errado?

- Mas é claro que está! Creio que o senhor deveria estudar a História Universal.

Veria que a Revolução Francesa, ocorrida há mais de 100 anos, mostrou a miopia da religião. Somente pessoas sem cultura ainda crêem que Deus tenha criado o mundo em seis dias. O senhor deveria conhecer um pouco mais sobre o que os nossos cientistas pensam e dizem sobre tudo isso.

- É mesmo? E o que pensam e dizem os nossos cientistas sobre a Bíblia?

- Bem, respondeu o universitário, como vou descer na próxima estação, falta-me tempo agora, mas deixe o seu cartão que eu lhe enviarei o material pelo correio com a máxima urgência. O velho então, cuidadosamente, abriu o bolso interno do paletó e deu o seu cartão ao universitário. Quando o jovem leu o que estava escrito, saiu cabisbaixo sentindo-se pior que uma ameba.

No cartão estava escrito: "Professor Doutor Louis Pasteur, Diretor Geral do Instituto de Pesquisas Científicas da Universidade Nacional de França".

O fato ocorreu em 1892. É verdadeiro e integrante da sua biografia.

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus.

Muito, nos aproxima."

(Louis Pasteur)

RESUMO

Neste trabalho uma pectinase alcalina comercial (E.C. 4.2.2.2) foi caracterizada quanto a sua atividade em diferentes tempos de incubação, e na presença de diferentes agentes químicos utilizados na etapa de purga do beneficiamento têxtil, com a finalidade de remover os constituintes não celulósicos presentes nas fibras de algodão, principalmente a pectina. Foram avaliados dois processos de biopurga: um com a adição dos agentes sequestrantes no início do processo e outro, adicionando-os após 30 minutos de tratamento enzimático. Para isso foram testados diferentes tipos de sequestrantes (Quimerol 535 e EDTA). Foi realizada também, para fins comparativos, uma purga convencional alcalina com as condições normalmente utilizadas nas indústrias. A comparação das propriedades dos tecidos, tais como hifrofilidade, brancura e percentual de pectina removida confirmou que a biopurga pode ser tão eficaz quanto o processo alcalino convencional. Os resultados mostram que a presença de EDTA diminui a atividade da pectinase em 85% e que a presença deste no início do processo acarreta em uma diminuição do teor de pectina removida, quando comparado aos outros processos. Os melhores resultados dos ensaios, em geral, ocorreram ao se utilizar o agente sequestrante Quimerol 535 no início do processo de biopurga, resultando em uma diminuição de 60% de pectina no tecido. Deste modo, ao se realizar este mesmo processo, nas mesmas condições, em aparelho de ultrassom, os resultados não apresentaram melhora significativa.

Palavras-chaves: Biopurga, pectinase, algodão.

ABSTRACT

In the present work, a commercial alkaline pectinase (E.C. 4.2.2.2) was characterized by its activity at different incubation times, and having the presence of different chemical agents used in the step of scouring of textile processing, in order to remove non-cellulosic constituents present in cotton fibers, especially pectin. Two bioscouring processes were evaluated: the sequestering agents were added at the beginning and after 30 minutes of the process. Two different types of sequestering agents were tested (Quimerol 535 and EDTA). It was also performed a scouring with conventional alkaline conditions, normally used in industries for comparison matter. Comparing the properties of the fabrics such as: wettability, whiteness and the percentage of pectin removed, confirmed that bioscouring can be as effective as the conventional alkaline process. The results show that the presence of EDTA decreases the pectinase by 85% and its presence at the beginning of the process influences a lower content of pectin removed when compared to other processes. The best results generally occurred when using the sequestering agent Quimerol 535 at the beginning of the bioscouring process, resulting in a decrease of 60% of pectin on the fabric. Thus, when the same process was carried out under the same conditions using an ultrasound equipment, the results showed no significant improvement.

Keywords: Bioscouring, pectinase, cotton.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Estrutura morfológica da fibra do algodão	28
Figura 1.2 – Projeção da estrutura da celulose de Haworth	29
Figura 1.3 – Estruturas do grupo terminal.....	29
Figura 1.4 – Estrutura primária de uma molécula de pectina (ácido poligalacturônico).....	33
Figura 1.5 – Estrutura da pectina	34
Figura 1.6 – Representação esquemática do mecanismo de ação de enzimas pectinolíticas	39
Figura 1.7 – Aplicações de enzimas nas etapas de beneficiamento têxtil	41
Figura 2.1 – Processo de biopurga com a adição do sequestrante após o tratamento enzimático.	54
Figura 2.2 – Processo de biopurga com a adição do sequestrante no início do tratamento enzimático.	55
Figura 2.3 – Processo de purga alcalina.	56
Figura 2.4 – Espaço de cor CIELAB.....	58
Figura 2.5 – Estruturas da pectina e do corante azul de metileno.	59
Figura 3.1 – Cinética da concentração de AR formado em função do tempo.....	62
Figura 3.2 – Estabilidade da atividade da pectinase em função do tempo de incubação.....	65
Figura 3.3 – Efeito dos agentes químicos na atividade da pectinase....	66
Figura 3.4 – Foto do gel após revelação mostrando as bandas das proteínas	68
Figura 3.5 – Fotografia das amostras de tecido tingidas com azul de metileno	77
Figura 3.6 – Resultados dos ensaios de hidrofiliidade para os processos de tratamento testados.	77
Figura 3.7 – Resultados dos ensaios de grau de branco para os processos de tratamento testados.....	78

Figura 3.8 – Gráfico do grau de branco em função da coordenada colorimétrica b^*	80
Figura A.1 – Curva padrão de log MM em função do R_f do padrão de massa molecular construída após corrida eletroforética.	96
Figura A.2 – Cinética de formação de AR apresentada como absorvância em função do tempo.....	97
Figura A.3 – Curva de calibração de glicose.	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Composição percentual da fibra (total) e da cutícula.....	30
Tabela 1.2 – Classificação das enzimas pécicas.....	38
Tabela 2.1 – Reagentes utilizados no trabalho experimental	50
Tabela 3.1 – Atividades específicas da pectinase.....	64
Tabela 3.2 – Quantificação de proteína e massa molecular da pectinase.	67
Tabela 3.3 – Massa molecular das proteínas presentes no padrão.	69
Tabela 3.4 – Efeito dos sequestrantes no Processo 1.	70
Tabela 3.5 – Efeito do sequestrante no Processo 2.....	71
Tabela 3.6 – Comparação entre os resultados dos ensaios obtidos após os processos de biopurga testado (processos 1 e 2).....	73
Tabela 3.7 – Efeito do tratamento do tecido sem adição de enzima.....	74
Tabela 3.8 – Resultados dos ensaios após tratamento alcalino dos tecidos.	75
Tabela 3.9 – Grau de branco e coordenadas de cor conferidas às amostras conforme o tipo de processo.	79
Tabela 3.10 – Comparação das biopurgas realizadas em ultrassom e no aparelho para tingimento Mathis.....	81
Tabela A.1 – Concentrações de BSA em solução de NaOH.	90
Tabela A.2 - Soluções-reagentes utilizados na preparação da solução tampão da amostra.....	92
Tabela A.3 - Reagentes para a preparação do gel de Poliacrilamida....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- [AR] = Concentração de açúcar redutor [$\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$]
A = Atividade específica [$\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$] ou [$\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$]
 a^* – Eixo do espaço de cor, correspondente às cores vermelho (valores positivos) e verde (valores negativos)
ABNT = Associação Brasileira de Normas Técnicas
Abs = Absorbância
AM = azul de metileno
AR = Açúcares redutores
 b^* – Eixo do espaço de cor, correspondente às cores amarelo (valores positivos) e azul (valores negativos)
CIE – Commission Internationale de l'Éclairage
CIELAB – Método de medida de cor que utiliza o espaço tridimensional L^*, a^*, b^*
 D_E = Diluição da enzima utilizada
DNS = Ácido 3,5 dinitro-salicílico
E.C. = Enzyme Commission
EDTA = Ácido etilenodiaminotetracético
 L^* – Luminância
PE = Pectinesterases
PG = Poligalacturonase
PGL = Pectato liase ou Poligalacturonato liase
pH = Potencial hidrogeniônico
PMGL = Pectina liase ou Polimetilgalacturonato liase
RB = Relação de banho
rpm = Rotação por minuto
SDS = Dodecil sulfato de sódio
t = Tempo de reação [min]
 t_i = Tempo de incubação [min]
U = Unidade de atividade enzimática [$\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]
 V_e = Volume da solução de enzima [mL]
 V_T = Volume total da solução [mL]
 W_t = Perda de massa

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	25
CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
1.1. SUBSTRATO TÊXTIL – ALGODÃO	27
1.1.1. Constituintes não celulósicos do algodão.....	30
1.2. SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS	31
1.2.1. Classificação	31
1.2.2. Estrutura	32
1.3. PECTINASES	35
1.3.1.1. Classificação.....	35
1.4. ENZIMAS NA INDÚSTRIA TÊXTIL	39
1.4.1. Etapa de Purga.....	41
1.4.1.1. Biopurga	43
1.5. EFEITO DOS AGENTES QUÍMICOS E TENSOATIVOS NO PROCESSO DE BIOPURGA	45
1.6. UTILIZAÇÃO DOS ULTRASONOS NOS PROCESSOS DE BIOPURGA	46
1.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
CAPÍTULO II - MATERIAIS E MÉTODOS	49
2.1. MATERIAIS	49
2.1.1. Substrato têxtil	49
2.1.2. Enzima	49
2.1.3. Reagentes e solventes.....	50
2.2. METODOLOGIAS	51
2.2.1. Caracterização da enzima pectinase	51
2.2.1.1. Cinética enzimática.....	51
2.2.1.2. Determinação da atividade da pectinase	52
2.2.1.3. Estudo do tempo de incubação da enzima	52
2.2.1.4. Determinação da influência de agentes químicos (utilizados em processos de purga) na atividade e estabilidade da enzima.....	52
2.2.1.5. Determinação da quantidade de proteínas	53
2.2.1.6. Caracterização enzimática em gel de eletroforese em condições desnaturantes (sds-page).....	53
2.2.2. Tratamentos dos tecidos de algodão.....	53
2.2.2.1. Purga Enzimática	54
2.2.2.2. Purga Alcalina	55
2.2.3. Avaliação do efeito da purga enzimática e alcalina	56
2.2.3.1. Determinação da perda de massa.....	56

2.2.3.2. Hidrofilidade	57
2.2.3.3. Grau de Branco ou Grau de Alvura	57
2.2.3.4. Determinação de pectina removida	58
CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
3.1. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA PECTINASE.....	61
3.1.1. Metodologia para determinação da atividade enzimática ..	61
3.1.2. Atividade da pectinase	63
3.1.3. Estabilidade da enzima com o tempo de incubação.....	64
3.1.4. Efeito dos agentes químicos na atividade da pectinase.....	65
3.1.5. Quantificação de proteínas e eletroforese	67
3.2. TRATAMENTOS DOS TECIDOS DE MALHA	69
3.2.1. Influência dos agentes sequestrantes nos processos de biopurga.	70
3.2.1.1. Adição de sequestrantes após 30 minutos de tratamento enzimático.	70
3.2.1.2. Adição de sequestrantes no início do processo enzimático.	71
3.2.1.3. Comparação entre os processos de biopurga (processos 1 e 2).....	72
3.2.2. Tratamento das amostras de tecido sem adição de enzima.	74
3.2.3. Purga alcalina.....	75
3.2.4. Avaliação da influência do ultrassom no processo de biopurga.	81
CONCLUSÕES	83
PERSPECTIVAS	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO I	89
ANEXO II	91
ANEXO III	97

INTRODUÇÃO

As fibras de algodão contêm aproximadamente 10% de impurezas não-celulósicas, cujo conteúdo depende da variedade e do ambiente de crescimento. A pectina é uma das principais impurezas não celulósicas das fibras de algodão e está localizada principalmente na cutícula da parede primária. A natureza hidrofóbica de ceras e pectinas é responsável pelo comportamento não úmido do algodão natural que impede um tingimento uniforme e um acabamento eficiente, etapas comumente realizadas sob condições aquosas (Kekos *et al.*, 2008).

O uso de enzimas em substituição aos produtos químicos normalmente utilizados em alguns processos têxteis reduz consideravelmente o impacto ambiental assim como os danos às fibras. Fato este, pelo qual nos últimos anos, com a crescente conscientização e preocupação com o meio ambiente, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de aplicar enzimas nas diferentes etapas do beneficiamento têxtil. O uso de enzimas na etapa da purga (biopurga) visa obter tecidos de fibras naturais com boas propriedades físico-químicas, mecânicas e alta hidrofiliabilidade. Em relação ao processo alcalino, a biopurga é realizada sob condições mais suaves, diminui o consumo de água e de energia, e gera efluentes mais facilmente tratáveis.

As pectinases são atualmente as enzimas mais eficientes para a biopurga do algodão, provavelmente devido a degradação e eliminação de pectinas fazendo as ceras mais flexíveis e fáceis de serem removidas sob apropriadas condições sem causar destruição da celulose (Kekos *et al.*, 2008).

O uso de agentes sequestrantes é imprescindível nos processos de purga e biopurga, já que estes possuem a capacidade de sequestrar íons presentes nas fibras, evitando assim, problemas nos processos de tingimento, estamparia e acabamento.

Há relatos na literatura que o ultrassom facilitaria os processos de absorção, limpeza e outras interações, já que teriam a capacidade de acelerar o transporte enzimático podendo reduzir o tempo de tratamento e ainda mais a quantidade de energia e danos na fibra (Silva, 2006).

O objetivo geral deste trabalho foi investigar o efeito da biopurga em tecidos de malha crua, compostos de fios 100% algodão, utilizando uma pectinase alcalina.

Os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- caracterizar a enzima pectinase quanto a sua atividade em diferentes tempos de incubação, e na presença de diferentes agentes químicos utilizados na purga;
- avaliar dois processos de biopurga: um com a adição do agente sequestrante no início do processo e outro após a reação enzimática;
- estudar a influência de diferentes agentes sequestrantes (Quimerol 535 e EDTA) no processo de biopurga;
- avaliar a influência do ultrassom no processo de biopurga;
- analisar amostras de tecido tratados e não tratados, com o processo enzimático e alcalino, quanto à hidrofiliade (absorção de água), branqueamento, perda de massa e teor de pectina removida;
- comparar com o processo alcalino convencional.

CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. SUBSTRATO TÊXTIL – ALGODÃO

O algodão é uma forma pura de celulose encontrada na natureza, é uma fibra de origem vegetal proveniente da planta *Gossypium*. (Araújo e Castro 1984). Muitas espécies são cultivadas para uso comercial, sendo que o comprimento médio das fibras de diferentes tipos de algodão varia de 22-50 mm, e seu diâmetro de 18-25 μm . (Agrawal, 2005)

As fibras de algodão têm uma estrutura fibrilar e a espessura das fibras varia entre 12 a 20 μm . O algodão apresenta “convulsões” que variam entre 4 a 6 μm por milímetro, sendo reversíveis em cada milímetro ou ao longo da fibra. Estas características permitem um rápido reconhecimento da fibra no microscópio óptico e eletrônico (Shore, 1995).

A cutícula é a parte mais externa da fibra, não celulósica. É constituída por ceras, gorduras, proteínas e pectinas, sendo, por isso, responsável pelas propriedades hidrofóbicas das fibras no seu estado natural ajudando a proteger a parte externa da fibra. Antes do algodão poder ser usado como fibra têxtil, é necessário remover a cutícula para assegurar a absorção das soluções de corante e dos outros reagentes durante os processos têxteis (Silva, 2006).

A parede primária é constituída por celulose (>50%), mas também está coberta pelos componentes da cutícula. As fibrilas externas desta camada estão paralelas ao eixo da fibra e formam com as internas uma rede aproximadamente ortogonal (Silva, 2006).

A parede secundária, a mais espessa e cristalina de todas, é majoritariamente celulósica. É constituída por uma camada externa denominada S1 e por uma interna denominada S2. Na camada S1 as fibrilas estão dispostas em espiral em redor da fibra, formando com o seu eixo um ângulo de 20-35° (Silva, 2006).

O mesmo acontece na camada S2 com a diferença que os feixes de fibrilas têm inversões no sentido do enrolamento, podendo formar um ângulo de 20-30°. A camada S2 constitui cerca de 95% do peso da fibra, tem alta cristalinidade e é responsável pela resistência mecânica das fibras (Silva, 2006).

A parede do lúmen só se observa em fibras de algodão muito maduras e a disposição dos feixes de fibrilas é semelhante à camada S1. O lúmen é a parte mais interna da fibra, apresentando-se sob a forma de

um canal central. É o que resta da célula inicial que originou a fibra e, por isso, contém restos de protoplasma, sais minerais e corantes responsáveis pela cor creme do algodão cru (Silva, 2006).

A sua estrutura morfológica encontra-se na **Figura 1.1**.

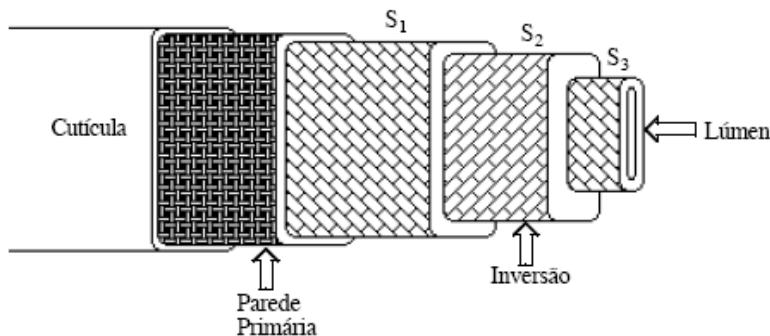


Figura 1.1 – Estrutura morfológica da fibra do algodão (Silva, 2006).

O algodão é uma fibra tradicional na manufatura de materiais têxteis, sendo composto quase exclusivamente por celulose. Este é um polissacarídeo que por hidrólise origina muitos monossacarídeos. Se as moléculas de monossacarídeo obtidas por hidrólise são hexoses, o polímero é designado por hexosano (Solomons, 1996).

Na natureza existem dois hexosanos importantes, os amidos, que representam o reservatório de energia dos organismos vivos, e a celulose, o material estrutural básico da maior parte dos vegetais.

A celulose é um polímero de β -D-glucose insolúvel em água. As propriedades físicas deste material resultam do peso molecular muito alto (cerca de 3000 unidades de glucose) e do fato de não ter ramificações. O aspecto estrutural mais importante da celulose é a ligação β -1,4 das unidades de glucose. O arranjo linear das unidades de glucose com a ligação β na celulose faz com que haja uma distribuição uniforme de grupos OH na extremidade de cada cadeia. Quando duas ou mais cadeias de celulose entram em contato, os grupos hidroxilas estão em posição ideal para unir integralmente as cadeias, formando ligações de hidrogênio. A ligação de muitas cadeias de celulose, por esta razão, constitui um polímero rígido, fibroso e insolúvel (Solomons, 1996).

As unidades fundamentais do polímero de celulose são essencialmente a sequência de grupos intermédios (I), o grupo terminal não-redutor (II), o grupo terminal redutor (III) e as ligações glucosídicas (**Figura 1.2**).

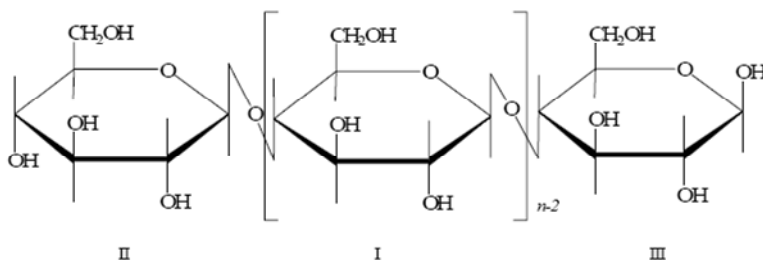


Figura 1.2 – Projção da estrutura da celulose de Haworth, n = grau de polimerização (Shore, 1995).

Cada unidade intermédia possui um grupo álcool primário e dois secundários. O grupo terminal não redutor possui mais um grupo álcool secundário na posição C4, e o grupo terminal redutor (posição C1), assim designado porque reduz a solução de Fehling, é um hemiacetal cíclico, e sob determinadas condições pode ter características de um álcool ou de um aldeído (**Figura 1.3**).

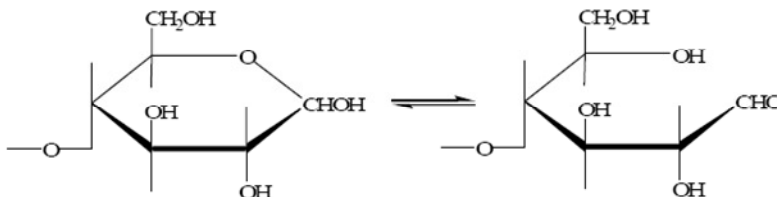


Figura 1.3 – Estruturas do grupo terminal redutor (Shore, 1995).

A cristalinidade corresponde ao arranjo regular das macromoléculas no espaço, formando microcristais. Foram encontradas cinco zonas aloamorfias, mas somente a celulose I e a celulose II são importantes para os processos têxteis. A celulose nativa ocorre na forma de celulose I e a celulose II é produzida por tratamento alcalino (mercerização) da celulose I e diferencia-se desta por ter as cadeias numa orientação anti-paralela. A conversão de celulose I em II, com inversão da polaridade das moléculas, tem lugar em fase sólida, de modo não totalmente compreendido. Admite-se que as microfibrilas da celulose I adjacentes na estrutura fibrilar apresentam estatisticamente uma disposição anti-paralela e, na presença de hidróxido de sódio, há

cruzamento de moléculas intermicrofibrilares, de modo que a conversão teria lugar sem desagregação da estrutura das fibras (Gama, 1996).

1.1.1. Constituintes não celulósicos do algodão

A fibra de algodão possui uma cobertura não-celulósica chamada cutícula que fica depositada na parede primária, a primeira parte de parede primária a ser formada (Losonczi, 2004)

A parede primária tem aproximadamente 0,1µm de espessura e compreende apenas 1% da espessura da fibra total. A porcentagem exata de cada componente da parede primária é determinada pelo tipo da planta, sua origem, condições de crescimento e pelo grau de maturidade (Losonczi, 2004).

A **Tabela 1.1** apresenta a composição da parede primária com cutícula e a fibra como um todo.

Tabela 1.1 – Composição percentual da fibra (total) e da cutícula.

Componentes	Composição em base seca (%)	
	Fibra total	Parede primária
Celulose	88 – 96	52
Proteína	1.1 – 1.9	7
Pectina	0.7 – 1.2	12
Ceras	0.4 – 1.0	12
Açúcares	0,2 – 0,3	3
Cinzas	0.7 – 1.6	14
Outros	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. (Maluf e Kolbe, 2003)

De todos os constituintes não celulósicos os que se encontram em maior porcentagem são as proteínas. A fibra de algodão e sua parede primária contém proteínas, aminoácidos livres e nitrogênio não protéico. Os aminoácidos livres que tem sido detectados são o ácido glutâmico, ácido aspártico, valina, serina e treonina (Losonczi, 2004).

A pectina é uma das principais impurezas não celulósicas das fibras de algodão e está localizada principalmente na cutícula da parede primária, onde a pectina é covalentemente ligada à celulose ou em outras plantas à hemicelulose ou forma ligações de hidrogênio com outros componentes (Li e Hardin, 1997). A natureza hidrofóbica de ceras e pectinas é responsável pelo comportamento não hidrofílico do algodão natural que impede um tingimento uniforme e eficiente e um acabamento comumente realizados sob condições aquosas (Lin e Hsieh, 2001).

Os sais inorgânicos (fosfatos, carbonatos e óxidos) e os sais de ácidos orgânicos presentes na fibra crua são apresentados como cinzas. Durante a produção do algodão, a planta absorve potássio e outros metais como nutrientes. Os seguintes metais são encontrados nas fibras cruas: potássio, cálcio, magnésio, sódio, ferro, manganês, cobre e zinco. Os metais no algodão podem contribuir com problemas nas etapas de branqueamento e de tingimento. A decomposição do peróxido, utilizado na etapa de branqueamento, pode ser catalisada por íons de ferro e de cobre, causando danos nas fibras. Sais insolúveis de cálcio e magnésio podem interferir com o tingimento (Losonczy, 2004).

1.2. SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS

A pectina possui um alto valor como alimento funcional extensamente utilizada como um agente gelificador e estabilizante. Também é um componente abundante, onipresente e multifuncional da parede celular de todas as plantas terrestres. Os pesquisadores de alimentos e pesquisadores de plantas compartilham uma meta para entender melhor a estrutura e função, ao nível molecular, de polímeros pécticos (Maller, 2008).

1.2.1. Classificação

Baseado no tipo de modificações das ligações da cadeia principal, substâncias pécticas são classificadas em protopectinas, ácidos pécticos, ácidos pectínicos e pectinas, sendo estes três últimos total ou parcialmente solúveis em água (Kashyap *et al.*, 2000):

- **Protopectinas** são semelhantes às substâncias pécticas e sofrem hidrólise restrita resultando em pectina e pectinas ácidas. Protopectina é

um termo usado ocasionalmente para descrever as substâncias pécticas insolúveis em água encontradas em tecidos de plantas e são utilizadas para produzir substâncias pécticas solúveis.

- **Ácidos pécticos** são galacturonanas contendo pequena quantidade de grupos metoxila. Sais de ácidos pécticos são chamados de pectatos.
- **Ácidos pectínicos** são galacturonanas com vários grupos metoxilas. Possuem a propriedade de formar um gel com açúcares e ácidos ou com certos outros compostos.
- **Pectinas** é um nome genérico para a mistura de diferentes compostos onde o ácido pectínico é o maior componente. Sua forma nativa está localizada na parede celular e pode estar interligada com outros polissacarídeos estruturais e proteínas para formar a protopectina insolúvel

1.2.2. Estrutura

Quimicamente, são um complexo coloidal de polissacarídeos ácidos, solúveis em água, composto de resíduos de ácido galacturônico (GalA) unidos por ligações α -1,4 (ácido α -1,4-D-galacturônico) parcialmente esterificados com grupos metil éster com metanol e possui um grau de neutralização capaz de formar gel com açúcares e ácidos em condições adequadas. Acredita-se que a pectina deve consistir em pelo menos 65% de GalA, mas também contém moléculas de L-ramnose, arabinose, galactose e xilose como correntes laterais. Ao contrário das proteínas, lípídeos e ácidos nucleicos, e sendo polissacarídeos, as substâncias pécticas não possuem massa molecular definida, variando de 25 a 360 kDa. (**Figura 1.4**) (Uenojo e Pastore, 2007).

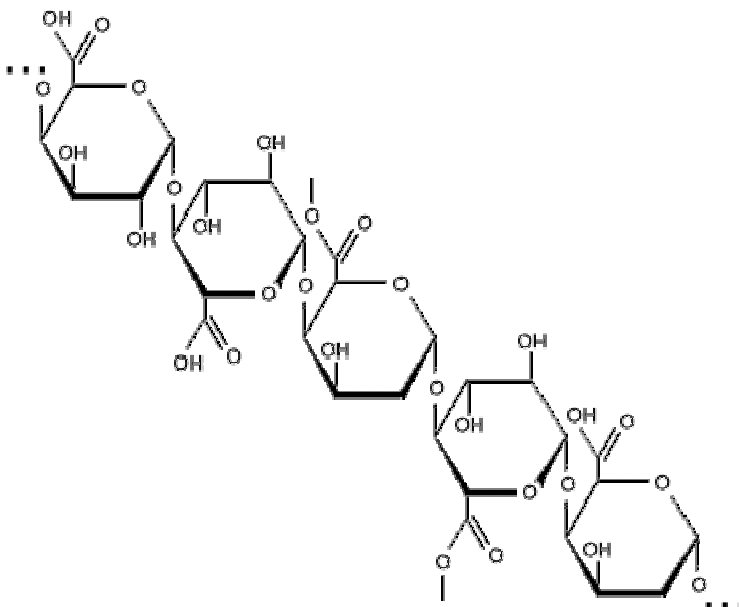


Figura 1.4 – Estrutura primária de uma molécula de pectina (ácido poligalacturônico).

A propriedade das pectinas dependerá do seu grau de esterificação, que se encontra em maioria em torno de 70%.

Pectinas com alto teor de metoxilas (acima de 50%) são frequentemente denominadas apenas “pectinas” e têm poder de geleificação na presença de açúcares e ácidos, enquanto que a geleificação de pectinas com baixo teor de metoxilação é possível na ausência de açúcares e na presença de alguns íons metálicos. (Uenojo e Pastore, 2007).

A pectina pode ser dividida em duas regiões: regiões lisas e regiões felpudas (**Figura 1.5**). A maioria é composta por três polissacarídeos estruturalmente bem caracterizados: homogalacturonana (HGA), ramnogalacturonana I (RGI) e ramnogalacturonana II (RGII). Estes três polissacarídeos formam uma rede, que tem um potencial considerável para a modulação das suas estruturas por ação de enzimas de degradação da parede celular.

Homogalaturonana representa a cadeia principal da molécula de pectina, consistindo de ligações 1,4- α -D-GalA.

A ramnogalacturonana I (RGI) está localizado na área altamente ramificada contendo grande número de cadeias laterais que consiste no dissacarídeo repetido $[1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GalA-(1}\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-L-Ramose-(1}\rightarrow4]$.

A ramnogalacturonana II (RGII) possui a estrutura mais complexa, com as cadeias laterais unidas aos resíduos de GalA.

A molécula de pectina é ramificada na parte da rhanogalacturonanas por cadeias laterais como arabinanas, galactanas ou arabinogalactanas que estão unidas por ligações $\beta\text{-}(1,4)\text{-ramnose}$. Nas cadeias laterais principais, a área de unidades de $(1\text{-}5)\text{-arabinose}$ e as unidades ligadas à galactose são unidas por ligações $\beta\text{-}(1\text{-}4)$. Além destes açúcares neutros, as cadeias laterais de pectinas também podem conter xilopirranose, D-glucopirranose, L-fucopirranose, considerando que, em RG II, D-apiose, 2-O-metil-D-xilose e 2-O-metil-L-fucose estão presentes.

Em RGI os resíduos de ácido galacturônico são frequentemente acetilados nas posições C2 e C3, mas a acetilação também foi encontrada na região homogalaturonana (Yadav *et al.*, 2008).

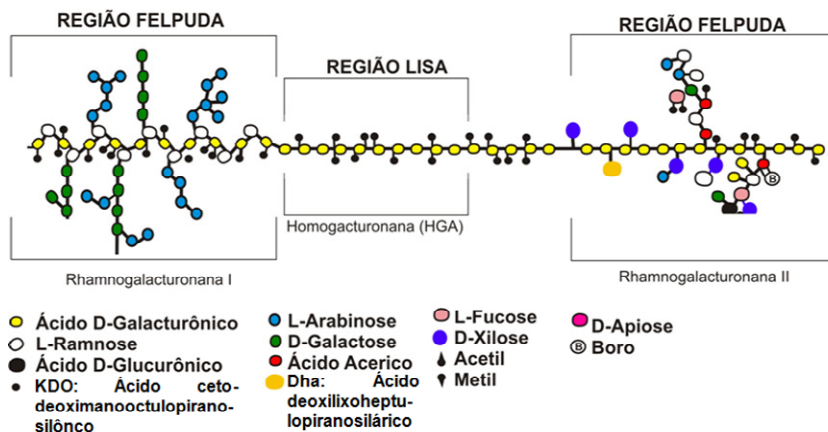


Figura 1.5 – Estrutura da pectina, (Yadav *et al.*, 2008).

1.3. PECTINASES

As substâncias pécnicas podem ser degradadas por enzimas pectinolíticas, produzidas em diferentes combinações pelas plantas e por microrganismos como fungos, leveduras e bactérias. Estas enzimas são muito utilizadas nas indústrias de sucos de frutas para reduzir a viscosidade, melhorar e aumentar a eficiência de filtração e de clarificação, no tratamento preliminar da uva em indústrias vinícolas, na maceração, liquefação e extração de tecidos vegetais, na fermentação de chá, café e cacau; para melhorar a extração de óleos vegetais; na extração de polpa de tomate e no tratamento e desengomagem de fibras naturais para as indústrias têxtil e de papel (Uenojo e Pastore, 2007).

As pectinases também são utilizadas para reduzir o amargor excessivo em cascas de citrus, restaurar o aroma perdido durante secagem e melhorar a firmeza de pêssego e pickles processados. A infusão de pectinase e β -glicosidase aumenta o aroma e as substâncias voláteis de frutas e vegetais, aumenta a quantidade de agentes antioxidantes em óleo de oliva extravirgem e reduz a indução ao ranço, além de outras aplicações (Uenojo e Pastore, 2007).

1.3.1.1. Classificação

A classificação das enzimas pécnicas está baseada no ataque ao esqueleto galacturônico, pela preferência de substrato (pectina, ácido pécnico ou protopectina), agindo por transeliminção ou hidrólise e por clivagem randômica (enzima endo-, liquidificante ou despolimerizante) ou terminal (enzima exo- ou sacarificante) (Uenojo e Pastore, 2007).

As enzimas pécnicas podem ser divididas em protopectinases, pectinesterases e enzimas despolimerizantes. Estas enzimas foram classificadas e nomeadas de acordo com a “Enzyme Commission” (EC), segundo as recomendações da IUPAC-IUB (Gupta *et al.*, 2005):

- **Protopectinases:** Estas enzimas solubilizam protopectina formando pectina solúvel altamente polimerizada.
- **Pectinesterases (PE):** catalisa a desesterificação do grupo metil da pectina formando ácido pécnico. A enzima atua preferencialmente no grupo metil éster da unidade galacturonato próximo a uma unidade galacturonato não esterificada.

- **Enzimas Despolimerizantes:** As enzimas despolimerizantes são classificadas de acordo com a clivagem hidrolítica (hidrolases) ou transeliminativa (liases) das ligações glicosídicas; mecanismos endo-(randômica) ou exo- (a partir do final da molécula) de ação e têm preferência por ácido pectico ou pectina como substrato. (Tabela 1.3)

Hidrolases

Nestas se incluem:

- **Polimetilgalacturonases (PMG):** catalisam a clivagem hidrolítica da ligação glicosídica α -1,4 da pectina. Estas são subdivididas em *endo-PMG* (EC 3.2.1.15), que causam a clivagem randômica da ligação glicosídica α -1,4 da pectina, preferencialmente, na pectina altamente esterificada e *exo-PMG* (EC 3.2.1.15), que causam a clivagem sequencial da ligação glicosídica α -1,4 da pectina na extremidade não redutora da cadeia da pectina.
- **Poligalacturonases (PG):** catalisam a hidrólise da ligação glicosídica α -1,4 do ácido pectico (ácido poligalaturônico). Elas são classificadas em *endo-PG* (EC 3.2.1.15), que catalisam a hidrólise randomica da ligação glicosídica α -1,4 do ácido pectico e *exo-PG* (EC 3.2.1.67), que catalisa a hidrólise sequencial da ligação glicosídica α -1,4 do ácido pectico na extremidade não redutora da cadeia.

Liases

As liases, também chamadas transeliminases, rompem ligações glicosídicas resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado.

A maioria das liases possuem peso molecular variando entre 30 e 40 kDa, com ponto isoelétrico de 7,0 à 11,0. Possuem pH ótimo na faixa alcalina (7,5 – 10,0) e temperatura ótima em 40 – 50 C. (Gupta *et al.*, 2005).

Entre as liases incluem-se as pectina liases e as pectato liases:

- **Pectina Liase (Polimetilgalacturonato Liase, PMGL, EC 4.2.2.10):** são as pectinases ácidas, catalisam a quebra da pectina por clivagem trans-eliminativa. São classificadas em *endo-PMGL*, que catalisa a clivagem randomica da ligação glicosídica α -1,4 da pectina e *exo-PMGL*, que catalisa a quebra seqüencial da pectina por transeliminação na extremidade da cadeia. O pH ótimo é em torno de 5,5 °C e a temperatura ótima entre 40 e 50 °C5.
- **Pectato Liase (Poligalacturonato Liase, PGL):** são as pectinases alcalinas, catalisam a clivagem da ligação glicosídica α -1,4 do ácido péctico por trans-eliminação. São divididas em *endo-PGL* (EC 4.2.2.2), que catalisa a clivagem aleatória da ligação glicosídica α -1,4 do ácido péctico e *exo-PGL* (EC 4.2.2.9), que catalisa a clivagem seqüencial da ligação glicosídica α -1,4 do ácido péctico na extremidade da cadeia (Kashyap *et al.*, 2000). Requer Ca^{2+} para atividade e tem pH ótimo na região alcalina, entre 7,5 e 10 e temperatura ótima entre 40 e 50 °C.

Tabela 1.2 – Classificação das enzimas pécticas (Uenojo e Pastore, 2007).

Tipo de pectinase	Nome sugerido pela EC	Nome comum	Número EC
Hidrolase	endo poligalacturonase	poligalacturonase	3.2.1.15
	exo poligalacturonase	poligalacturonase	3.2.1.67
	endo polimetilgalacturonase	pectina hidrolase	
	exo polimetilgalacturonase	pectina hidrolase	
Liase	endo poligalacturonase liase	pectato liase	4.2.2.2
	exo poligalacturonase liase	pectato liase	4.2.2.9
	endo polimetilgalacturonato liase	pectina liase	4.2.2.10
	Exo polimetilgalacturonato liase	pectina liase	

Foi reportado na literatura (Agrawal, 2005) que a capacidade pectinolítica das pectinases alcalinas (PGL) é superior em relação as pectinases ácidas (PMGL) em pectinas de fibras de algodão. A **Figura 1.6** mostra esquematicamente os mecanismos de clivagem diferentes de PMGL e PGL em uma molécula de pectina. O PMGL quebra o ácido galacturônico através de reação de hidrólise ácida, enquanto a pectina PGL degrada por uma reação de β -eliminação.

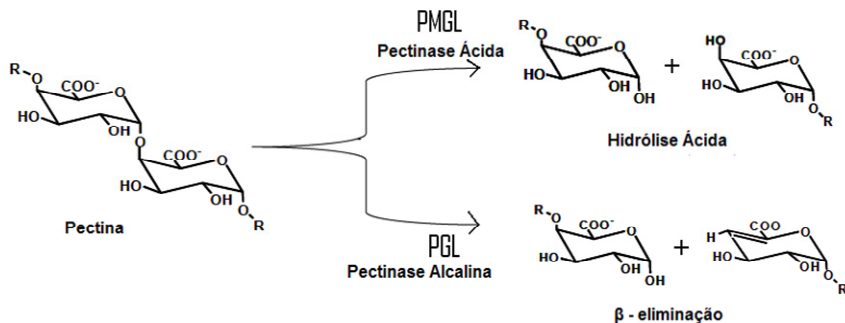


Figura 1.6 – Representação esquemática do mecanismo de ação de enzimas pectinolíticas: PMGL (poligalacturonase) e PGL (pectato liase) na pectina (Agrawal, 2005).

Pectato liases ou PGLs são produzidas por muitas bactérias e alguns fungos patogênicos, com endo-PGLs sendo mais abundante do que exo-PGLs. PGLs tem sido isoladas de bactérias e fungos associadas com deterioração dos alimentos e de podridão. Elas tem sido relatadas em *Colletotrichum lindemuthionum*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Erwinia carotovora*, *Amucala sp.*, *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea*, *Colletotrichum magna*, *E. chrysanthemi*, *Bacillus sp.*, *Bacillus sp. DT-7*, *C. gloeosporioides*. (Gupta *et al.*, 2005).

1.4. ENZIMAS NA INDÚSTRIA TÊXTIL

A utilização de enzimas no processo têxtil ocorre desde a metade do século XIX, quando extrato de malte foi usado para remover gomas amiláceas de alguns artigos têxteis antes da estampagem. Em 1919, as amilases foram introduzidas no mercado. Essas enzimas causam a transformação do amido em compostos solúveis em água. (Aly *et al.*, 2004)

Com o advento dos detergentes biológicos na década de 1960, as proteases passaram a ser parte das formulações de detergentes, especificamente para remover manchas orgânicas das roupas causadas por proteínas (ex.: de ovo, sangue).

No final da década de 1970, descobriu-se que as celulases acrescentavam detergência à lavagem de tecidos e removiam a fibrilação em múltiplas lavagens. Hoje, as celulases são incluídas em muitos

detergentes em pó, especialmente aqueles que são ativos na faixa alcalina. Existem também outras aplicações para as celulases, como na remoção enzimática de fibrilas e de pilosidade dos tecidos ou malhas de algodão, etapa esta conhecida como biopolimento. Foram descobertas também outras formas de emprego dessas enzimas no beneficiamento, que dão um aspecto envelhecido aos artigos de denim e outras peças de vestuário (Gübitz, 2001).

Baseado na composição de impurezas não celulósicas do algodão, várias enzimas, como as pectinases alcalinas ou ácidas, celulases, proteases, xilanases e lipases, tem sido investigadas e avaliadas como agentes na biopurga. As pectinases são as enzimas mais efetivas para a biopurga de algodão provavelmente por causa da degradação e eliminação de pectinas, eliminando facilmente as ceras sob condições adequadas de incubação e assim, melhorando a absorção das matérias têxteis, sem causar destruição à celulose (Kekos *et al*, 2008).

A maceração do linho foi a primeira aplicação biotecnológica no processamento têxtil. Há mais de 2.000 anos, o crescimento de microorganismos no linho era usado para a separação das fibras dos caules da planta.

Os avanços na biotecnologia possibilitaram a criação de misturas especiais de enzimas para aplicações específicas. Por exemplo, foram desenvolvidas as amilases para processos de desengomagem em temperaturas de 100°C, ao passo que monocomponentes de celulases foram identificados como sendo superiores às enzimas nativas em várias aplicações têxteis. Além das enzimas hidrolíticas como as celulases, amilases, pectinases (biopurga) e proteases (acabamento de lãs), outras atividades enzimáticas, inclusive as oxidoreduções, tem-se revelado ferramentas poderosas em várias etapas do processamento de têxteis, como mostra a **Figura 1.7** (Gübitz, 2001).

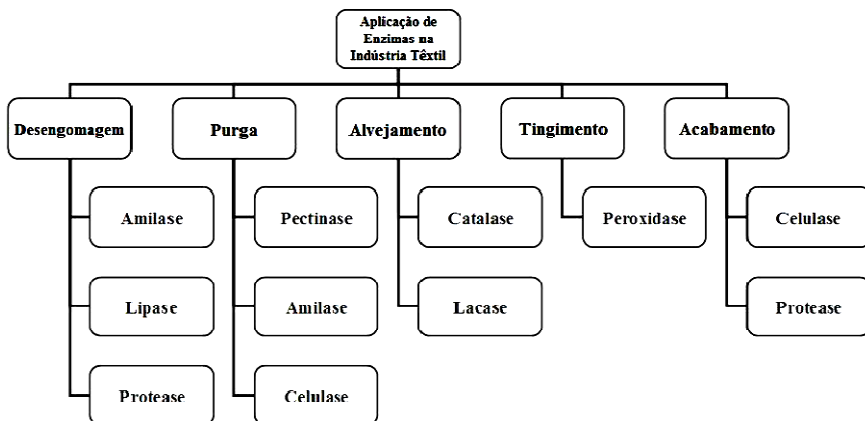


Figura 1.7 – Aplicações de enzimas nas etapas de beneficiamento têxtil.

A aplicação da biotecnologia têxtil nas etapas úmidas é um exemplo de processos ambientalmente corretos.

As indústrias têxteis utilizam diversos produtos químicos em diferentes processos. Estes produtos, após o uso, causam poluição nos efluentes, alguns são corrosivos podendo causar danos nos equipamentos e ao próprio substrato. Entretanto, com a introdução dos processos enzimáticos, uma produção de um ambiente favorável pode ser assegurada. (Aly *et al.*, 2004)

A poluição causada nas águas residuais pelo convencional acabamento têxtil tem orientado pesquisas para a aplicação de enzimas nas etapas úmidas das indústrias têxteis. As enzimas, sendo produtos naturais são completamente biodegradáveis e realizam seu trabalho eficientemente sem deixar nenhum poluente.

1.4.1. Etapa de Purga

Anteriormente ao tecido de algodão cru ser tingido em processo úmidos, ele deve ser limpo a fim de torná-lo em hidrofílico. O método industrial convencional inclui um tratamento com hidróxido de sódio a alta temperatura seguido de extensiva lavagem. Neste processo, constituintes hidrofóbicos (ceras e gorduras) e outros compostos não-celulósicos (pectinas, proteínas e ácidos orgânicos) são removidos de

uma maneira não seletiva. Mais precisamente, o processo de purga é baseado na reação entre as impurezas do algodão e o hidróxido de sódio. Ceras e gorduras são ésteres de ácidos graxos com glicerol e constituem cerca de 37% a 47% dos componentes de gordura total. Eles têm baixos pontos de fusão e são hidrolisados em sabões e glicerol (reação de saponificação) com bastante facilidade usando uma solução de NaOH. As altas temperaturas com o hidróxido de sódio também convertem outros constituintes não celulósicos da cutícula (pectinas, hemiceluloses e proteínas) em produtos solúveis em água.

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 sob 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 pH rigoroso na temperatura requerida para a purga, acaba ocasionando danos para muitas fibras. Apesar da purga alcalina ser efetiva e o custo do hidróxido de sódio ser baixo, o processo não é ecologicamente viável pois consome grandes quantidades de energia, água e agentes auxiliares. A eficiência do processo de purga alcalina está diretamente relacionado ao sucesso das operações de processamento úmido subsequentes: alveamento, tingimento, mercerização e acabamento. A fibra purgada apresenta-se limpa, com capacidade absorvente e possibilidade de dano oxidativo (Freitas, 2009)

Este processo gera elevadas quantidades de efluentes com características muito alcalinas, ocasionando problemas sob um ponto de vista ambiental devido à grande poluição nos efluentes têxteis e do ar. Por outro lado, acarreta danos à celulose resultando num decréscimo da resistência à tração dos tecidos (Buschle-Diller *et al.* 1998). A purga alcalina pode também causar o encolhimento do tecido e mudanças físicas e mecânicas nas propriedades dos tecidos. (Lin e Hsieh, 2001). Várias pesquisas têm focado na substituição deste processo pelo enzimático (Biopurga), que ocorre em condições suaves de reação.

1.4.1.1. Biopurga

A biopurga, biopreparação, purga enzimática ou *bioscouring* é um novo processo baseado na idéia de atingir especificamente as impurezas não celulósicas com enzimas específicas. Por exemplo, pectinases podem ser usadas para a decomposição de substâncias pectínicas; proteases para proteínas; lipases para gorduras. Alguns dos componentes naturais associados com componentes não-celulósicos podem ser eliminados da fibra durante o processo de biopurga. Uma vantagem adicional desse processo é que além de conservar energia, é ambientalmente correto e as enzimas usadas para biopurga não afetam a espinha dorsal da celulose, limitando os danos na 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).

Enzimas como pectinases, proteases, celulases e lipases tem sido examinadas pela degradação e subsequente remoção de diferentes componentes naturais presentes na camada externa das fibras de algodão. Os melhores resultados têm sido obtidos com pectinase ou uma pectinase em combinação com uma celulase. Uma pectinase alcalina provou ser especialmente efetiva. Isso porque a pectina age como uma cola na parede primária das células de algodão. Após a ação da pectinase ocorre a desestabilização da estrutura da pectina e os diferentes componentes presentes na parede primária podem ser removidos facilmente em uma subsequente etapa de lavagem. Entretanto, a biopurga baseada na pectinase não remove os fragmentos de capulho e ramos, conhecidos como piolhos. Isto pode ser um benefício quando se deseja uma “aparência natural” do produto, porém um problema quando se deseja colorir em tons mais leves. Soluções enzimáticas para este problema vêm atualmente sido investigadas com o uso de celulases (Gerhartz, 2004).

- **Biopurga com pectinase**

As pectinases para serem utilizadas na biopurga, são selecionadas com base na sua compatibilidade de pH e temperatura, levando em conta o tempo necessário de tratamento, qualidade do produto final, absorção de água, brancura e residual pectina (Hoondal *et al.*, 2002).

Segundo Tzanov e seus colaboradores, tanto as pectinases ácidas como as alcalinas se mostraram igualmente eficientes em termos de absorção assim como a purga convencional alcalina. (Tzanov et al., 2001).

O tratamento com pectinase modifica a morfologia das fibras de algodão. O algodão cru tem uma aparência suave e uma superfície lisa, sem irregularidades sendo um reflexo do estado amorfo da cutícula. Após o tratamento com a pectinase a superfície da fibra vem a ser atacada primeiro, e o motivo das mudanças é proposta pelas pectinases que digerem pectinas, as quais fazem parte da estrutura que segura a cutícula na superfície das fibras (Li e Hardin, 1998).

Ensaio de perda de massa, hidrofiliidade, branqueamento e residual de pectina dos tecidos pré-tratados têm efeitos significativos sobre a eficiência dos processos posteriores do beneficiamento têxtil, ou seja, é necessário obter bons resultados nestes ensaios, o que garante uma boa purga, para se obter melhores resultados nas etapas seguintes.

- **Perda de massa**

A perda de massa pode se referir ao material desprendido da fibra, podendo ser uma indicação indireta de perda de pectina em sua parede primária, mas pode também indicar a degradação da fibra de celulose em si mesma, resultando em elevada perda de massa e diminuição da resistência das fibras levando a um produto final de qualidade inferior.

- **Pectina removida**

A determinação do teor de pectina removida das amostras de tecido é de fundamental importância na avaliação da biopurga com a enzima pectinase já que a pectina é o substrato específico a ser atacado.

O método do tingimento com o corante azul de metileno (AM) para determinação da quantidade de pectina removida do tecido, leva em conta que a purga alcalina remove toda a pectina presente nas fibras do tecido (100%), já que o ideal é chegar, com o tratamento enzimático, a resultados iguais ou melhores à purga convencional alcalina. Assim neste método, a purga alcalina é utilizada como padrão. Quanto maior a

quantidade de AM absorvida nas fibras, maior é o conteúdo de pectina, e, portanto um azul mais escuro é obtido após o tingimento.

- **Grau de branco**

Apesar de o principal objetivo da purga não ser o branqueamento do tecido, a remoção das impurezas resulta em um aumento no grau de branco em relação ao tecido não tratado. Isto de certa forma indica se houve ou não remoção de componentes não celulósicos (objetivo da purga), permitindo que o tecido seja branqueado definitivamente na etapa de alvejamento, e tinto com sucesso.

- **Hidrofilidade**

O tecido de algodão cru é hidrofóbico e pode ser caracterizado por um tempo de molhabilidade de mais de 60 segundos. Pode-se afirmar que os tratamentos enzimáticos na presença de um surfactante adequado melhoram na penetração da água no tecido de algodão para um nível melhor, reduzindo esse tempo de molhabilidade, tornando-o suficiente para um bom tingimento, já que para se garantir um tingimento uniforme, é necessário que o tempo de absorção do corante seja praticamente instantâneo.

1.5. EFEITO DOS AGENTES QUÍMICOS E TENSOATIVOS NO PROCESSO DE BIOPURGA

Tensoativos são compostos anfifílicos, orgânicos ou organometálicos que formam colóides ou micelas em solução. Substâncias anfifílicas ou anfílicas são moléculas que possuem regiões distintas e características como hidrofóbicas e hidrofílicas. Os tensoativos causam influência na atuação das enzimas (Freitas, 2009). O uso de surfactante oferece umectabilidade, conduzindo o substrato ao contato íntimo com as enzimas e permitindo às enzimas alcançarem diferentes lugares inacessíveis (Freitas, 2009).

Os agentes sequestrantes são fundamentais no processo de purga da indústria têxtil pela sua capacidade de sequestrar íons presentes nas fibras que devem ser eliminados. A ausência de sequestrantes pode

acarretar em precipitados na superfície do tecido, causados pela combinação dos íons cálcio e magnésio com outros produtos do banho. Esses inconvenientes causarão problemas nos processos de tingimento, estamparia e acabamento (Li e Hardin, 2001).

Existem controvérsias a respeito do efeito de agentes sequestrantes na eficácia das enzimas. Csiszar reportou em seu trabalho que a adição de EDTA acelera a hidrólise de pectinas (Csiszar, 2001).

O EDTA remove íons cálcio que formam pontes com a pectina e assim torna mais acessível para a ação da enzima. Entretanto, se o EDTA é utilizado em um pré-tratamento a eficiência das enzimas pectinase e xilanase é reduzida, devido provavelmente a precipitação de pectina em uma forma mais compacta e uma estrutura menos acessível. Algumas enzimas possuem átomos de metais associadas a sua estrutura, que são afetadas pelo EDTA, que tende a remover estes metais e então, altera o funcionamento normal destas enzimas (Niaz *et al.*, 2009).

1.6. UTILIZAÇÃO DOS ULTRASSONS NOS PROCESSOS DE BIOPURGA

A aplicação dos ultrassons de acordo com a frequência é dividida em duas áreas: alta frequência e baixa intensidade (1-10 MHz), normalmente usadas para fins de diagnóstico em medicina e engenharia; e baixa frequência e alta intensidade (20-100 kHz), usualmente aplicadas em limpezas e reatividade química (Silva, 2006).

A onda de ultra-som, como todas as ondas de som, consiste em ciclos de compressão e expansão (rarefação). Os ciclos de compressão exercem uma pressão positiva no líquido, havendo uma aproximação entre as moléculas; por sua vez os ciclos de rarefação exercem uma pressão negativa afastando as moléculas umas das outras. Durante o ciclo de expansão, a onda de som com intensidade suficiente pode provocar a formação de cavidades (Silva, 2006).

Os processos enzimáticos, relativamente aos processos tradicionais, não necessitam de tanta energia nem de quantidades de água tão elevadas, reduzindo-se também o uso de produtos químicos. Em adição, as águas residuais provenientes dos tratamentos enzimáticos são biodegradáveis. Assim, os processos enzimáticos oferecem muitas vantagens, existindo, no entanto, algumas desvantagens quando comparados com os métodos tradicionais, sendo normalmente mais caros e exibindo velocidades de reação mais baixas. No entanto, a

tecnologia ultrasonica pode favorecer os processos enzimáticos, tornando-os mais curtos (Karaboğa *et al.*, 2007).

Os efeitos dos ultrasons sobre as enzimas não são muito conhecidos e observam-se resultados contraditórios quando estas são tratadas a intensidades elevadas. Têm sido efetuados estudos referentes a influência das diferentes intensidades nas enzimas, verificando-se que as altas intensidades dos ultra-sons causam uma diminuição na atividade de muitas enzimas “*in vitro*”, sendo esta a possibilidade que se atribui à mudança na estrutura das moléculas biológicas. A baixa intensidade dos ultrasons em alguns casos pode aumentar a atividade de enzimas livres (Silva, 2006).

Somente algumas enzimas são desativadas por aplicação de sistemas de ultrasons a intensidades elevadas, visto que a sonificação não desnatura todas as proteínas, contrariamente à desnaturação pelo calor (Silva, 2006).

Quando as amostras são colocadas em solução enzimática, as moléculas de enzimas, que são relativamente grandes, vão em direção à amostra e são adsorvidas à superfície. Contudo, este processo poderá ser lento devido ao tamanho da enzima. Esta volumosa molécula não se move em direção à interface muito facilmente. A aplicação dos ultrasons tem a capacidade de acelerar o transporte enzimático. A combinação de sistemas de ultra-sons com tratamentos enzimáticos convencionais nos processos têxteis acarreta vantagens significativas, como a redução da quantidade de energia (redução dos custos de operação), uniformidade no tratamento, redução dos tempos de tratamento, minimização dos danos na fibra (Karaboğa *et al.*, 2007).

1.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Segundo estudos realizados por Buchert e Pere (2000), a remoção da pectina resulta também em uma menor quantidade de ceras na superfície do algodão. Isto conseqüentemente promove uma melhora na absorção de água pelo tecido, o que mantém a hipótese de que há ligações químicas entre ceras e pectinas.

De acordo com estudos realizados por diversos pesquisadores, a pectinase se mostrou a enzima mais eficiente na remoção de componentes não celulósicos presentes nas fibras de algodão (Buschle-Diller *et al.*, 1998; Li & Hardin, 1997; Csiszar *et al.*, 2001). É reportado, também, com base na morfologia das fibras de algodão, que pectinas

parcialmente esterificadas estão disponíveis em abundância na superfície externa da parede primária. Como o grau de esterificação da pectina interfere no tipo de mecanismo promovido pela pectinase ácida ou alcalina, as pectinases alcalinas são as que apresentam melhor desempenho do que pectinases ácidas. Isto ocorre porque a velocidade de hidrólise da pectina pela pectinase ácida é menor do que a velocidade de β -eliminação pela pectinase alcalina.

Devido a estes relatos, optou-se pela utilização de uma pectinase alcalina para realização dos estudos de biopurga.

CAPÍTULO II - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

2.1.1. Substrato têxtil

Nos tratamentos efetuados foi utilizado como substrato, tecidos de malha de fio cardado 100% algodão cru, de aproximadamente 7 g e com 19,5 cm em cada lado, resultando em uma massa específico de 184 g/m². As amostras foram cedidas pela malharia Brandili.

2.1.2. Enzima

Foi utilizada uma pectinase alcalina comercial, classificada como pectato liase (E.C. 4.2.2.2), com nome comercial de Bioprep 3000L, fornecida pela Novozymes.

2.1.3. Reagentes e solventes

Tabela 2.1 – Reagentes utilizados no trabalho experimental

Reagentes	Marca	Grau de pureza (%)
Pectina cítrica	Vetec	---
Tris(hidroxi metil)aminometano P.A	Vetec	99,8 – 100,1
Cloreto de cálcio anidro	Vetec	96%
Cloreto de sódio P.A	Nuclear	99,0 – 100,5
Ácido clorídrico P.A	Nuclear	36,5 – 40,0
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	Vetec	99,0
Tartarato de sódio e potássio P.A	Vetec	99,0 – 102,0
Hidróxido de sódio	Cromoline Química Fina	98,0
EDTA P.A	Nuclear	99,0 – 101,0
Quimerol 535	Quimisa	---
Triton X-100	Nuclear	---
Ácido acético Glacial P.A	Nuclear	99,5 – 100,5
Azul de Metileno	Reagen	---

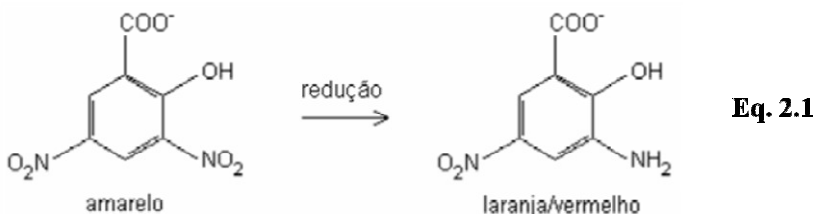
2.2. METODOLOGIAS

2.2.1. Caracterização da enzima pectinase

Na cadeia da pectina há regiões onde o ácido galacturônico é substituído por açúcares redutores (AR).

A medida da cinética enzimática e da determinação da atividade da pectinase, foi realizada pela determinação da quantidade de açúcar redutor liberado (Miller, 1959) onde empregou-se o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) que permite dosar a quantidade de açúcares redutores presentes em solução.

Em solução alcalina, o ácido 3,5-dinitrosalicílico é reduzido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. O DNS que reage com o açúcar liberado na reação, mudando a intensidade da cor de amarelo para laranja.



2.2.1.1. Cinética enzimática

Foi realizado um estudo preliminar para avaliar de que maneira a pectinase age sobre o substrato, para posterior determinação de sua atividade. Para tal incubou-se 100 μL da solução da enzima (1mL/L) a 30°C na presença de 900 μL de 0,25% (p/v) de pectina cítrica, 20 mM de NaCl, e 0.1 mM de CaCl_2 em tampão Tris-HCl 0,05M pH 9,5 em diferentes tempos: 0, 0,5, 1, 4, 7, 10, 15, 30, e 60 minutos, seguido da dosagem de açúcar redutor no ensaio. Foram feitas amostras de branco sem a adição de enzima. Após cada tempo de reação, os açúcares redutores liberados foram medidos adicionando-se 1mL do reagente DNS e em seguida a solução foi fervida por 10 minutos, resfriada em banho de gelo e a absorbância foi lida a 530 nm. Foi feita então, uma curva de calibração de glicose construída com soluções

padrões de glicose com concentrações variando de 0,2 a 1,0 $\mu\text{mol/mL}$ em solução tampão tris-HCl pH 9,5.

2.2.1.2. Determinação da atividade da pectinase

A atividade da pectinase foi determinada da mesma maneira medindo-se o aumento de açúcares redutores presentes no ácido poligalacturônico (Miller, 1959). Uma solução de enzima de 100 μL foi incubada em tubo de ensaio primeiramente a 30°C na presença de 900 μL de 0,25% (p/v) de pectina cítrica, 20 mM de NaCl, e 0,1 mM de CaCl_2 em tampão Tris-HCl 0,05M pH 9,5 durante 5 min. Após este tempo adicionou-se 1mL de DNS e a solução foi fervida por 10 minutos e resfriada em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se 2mL de H_2O e a absorbância foi lida a 530 nm. Foram feitas amostras de branco sem a adição de enzima. Foi feita uma curva de calibração de glicose para a obtenção da concentração de açúcar redutor liberado. O mesmo procedimento foi também realizado a 55 °C e pH 8,5.

Segundo a *Enzyme Commission*, uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de açúcar redutor por minuto.

2.2.1.3. Estudo do tempo de incubação da enzima

Para saber se a enzima mantém sua atividade durante um determinado tempo, foi preparada a solução de enzima e incubada a 55°C e então foram feitas medidas de atividade como explicado no item 2.2.1.2 nos tempos de incubação de 0, 1, 4 e 24h.

2.2.1.4. Determinação da influência de agentes químicos (utilizados em processos de purga) na atividade e estabilidade da enzima.

Foi realizado um estudo de como os agentes surfactante e sequestrante (conhecido também como agente quelante) alteram o comportamento da catálise enzimática e também de sua influência na estabilidade da pectinase.

Para isto, foram incubados a 55°C 25mL da solução de enzima (1mL/L) primeiramente apenas com 25 μL de Triton X-100 e foi realizada a medida de atividade conforme o item 2.2.1.2. Em seguida, a

solução de enzima foi incubada também com 25 µL de cada um dos agentes sequestrantes de cada vez (Quimerol 535 e EDTA) juntamente com os 25 µL de Triton X-100, e então estas atividades foram medidas em 0 e 30 minutos de incubação.

2.2.1.5. Determinação da quantidade de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada segundo a metodologia descrita por LOWRY *et al.* (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. A unidade protéica foi definida como mg de proteína/mL (**Anexo I**).

2.2.1.6. Caracterização enzimática em gel de eletroforese em condições desnaturantes (sds-page)

A eletroforese foi realizada segundo o método descrito por Laemmli em 1970, usando o gel de corrida a 12,5% e o gel de concentração 5%, confeccionando géis de poli(acrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS). O padrão de massa molecular usado como marcador foi 6,5 a 200 kDa (SDS-PAGE) e as bandas foram evidenciadas com coomassie brilliant blue (**Anexo II**).

2.2.2. Tratamentos dos tecidos de algodão

Determinou-se a influência de diferentes agentes sequestrantes comerciais (Quimerol 535 e EDTA) em diferentes etapas do processo de biopurga.

Para isto foram realizados dois processos de biopurga: um com a adição dos sequestrantes no início do processo e outro, após 30 minutos de tratamento enzimático.

O processo que se mostrar mais eficaz será realizado em aparelho de ultrassom de baixa frequência (40 KHz) marca Unique.

Para fins comparativos, foi realizada também a purga alcalina em condições normalmente utilizadas pelas indústrias têxteis.

2.2.2.1. Purga Enzimática

Os experimentos foram realizados no aparelho de laboratório para tingimento até 135°C ALT-B 9306, com microprocessador Datex Pico II, marca Mathis.

Amostras de 7g de tecido de malha de algodão cru foram colocadas em canecos de 500 mL, juntamente com a solução tampão de tris-HCl pH 8,5 mantendo uma relação de banho (RB) de 1:20 na presença de um surfactante (Triton X-100) e um sequestrante, ambos não iônicos e na concentração de 1g/L. A concentração da enzima utilizada foi de 1000 U/g_{tecido}. As incubações foram efetuadas com temperatura controlada de 55 °C pelos tempos indicados nas figuras 2.1 e 2.2 e a 40 rpm. Após o tempo de purga a temperatura do aparelho foi elevada a 90°C, onde permaneceu por 10 minutos. Em seguida foi feita uma lavagem a quente à temperatura de 55°C e uma a temperatura ambiente. Por fim os tecidos foram torcidos e secos ao ar.

Os ensaios foram realizados segundo dois processos distintos:

- **Processo 1:** Adicionando-se o sequestrante após 30 minutos de tratamento enzimático, conforme a **Figura 2.1**.

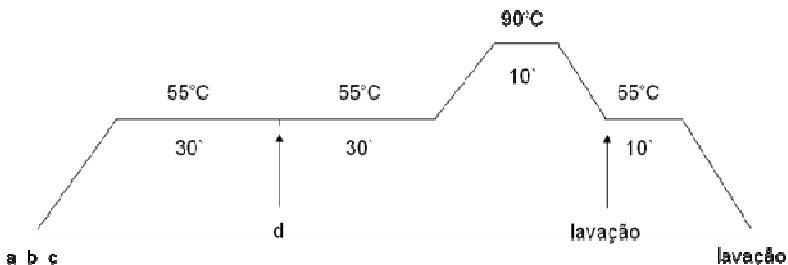


Figura 2.1 – Processo de biopurga com a adição do sequestrante após o tratamento enzimático (a) tampão pH 8,5; (b) surfactante (1mL/L); (c) pectinase (1000U/g_{tec}); (d) sequestrante (1mL/L).

- **Processo 2:** Adicionando-se todos os compostos no início do processo, conforme a **Figura 2.2**.

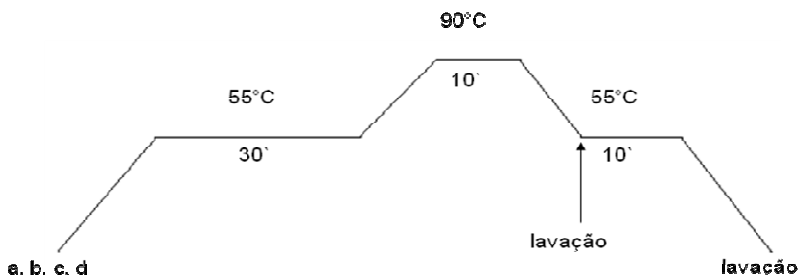


Figura 2.2 – Processo de biopurga com a adição do sequestrante no início do tratamento enzimático (a) tampão pH 8,5; (b) surfactante (1mL/L); (c) pectinase (1000U/g_{tec}); (d) sequestrante.

Neste processo foi realizada também uma biopurga sem a adição da enzima.

2.2.2.2. Purga Alcalina

A correspondente purga alcalina foi efetuada com os mesmo tecidos no mesmo aparelho. As amostras de tecido foram incubadas a 90°C, por 30 min a 40 rpm, em uma solução de 5g/L de hidróxido de sódio (RB 1:20), 1g/L de Triton X-100, 1g/L de Quimerol 535. Os tecidos purgados foram então lavados uma vez a 55°C por 10 minutos e então novamente foi adicionada água destilada com 1mL de ácido acético e foi deixado por mais 10 min. Após esse tempo, os tecidos foram lavados a temperatura ambiente, torcidos e secos ao ar. (**Figura 2.3**)

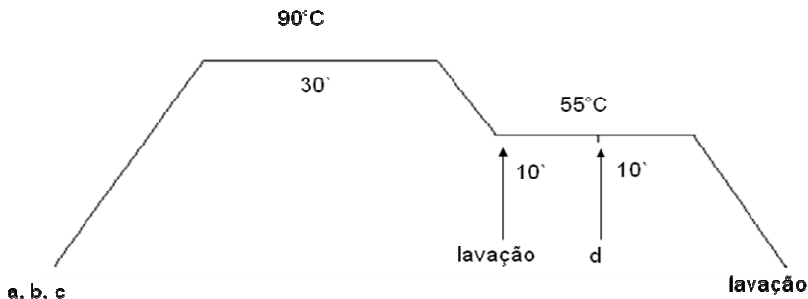


Figura 2.3 – Processo de purga alcalina (a) NaOH (5g/L); (b) surfactante; (c) sequestrante; (d) ácido acético (1mL).

2.2.3. Avaliação do efeito da purga enzimática e alcalina

As amostras de malha de fio cardado 100% algodão sem tratamento e tratados, com o processo enzimático e alcalino, foram caracterizadas quanto à perda de massa, hidrofiliidade (absorção de água), grau de branco e teor de pectina removida. Estes ensaios, exceto o último, foram realizados em triplicata.

2.2.3.1. Determinação da 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. A equação (2.1) foi utilizada para o cálculo da perda de massa percentual (ALY *et al.*, 2004):

$$W_t = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \quad (\text{Eq. 2.2})$$

2.2.3.2. Hidrofilidade

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.

2.2.3.3. Grau de Branco ou Grau de Alvura

O grau de branco foi determinado nas amostras submetidas 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 (Método Ganz).

A quantificação da cor foi realizada através do sistema CIELAB, espaço de cor ($L^* a^* b^*$) e diferença de cor (ΔE^*_{ab}) (Berns, 2000). O método localiza a cor em um espaço tridimensional, utilizando como coordenadas: L^* (luminância) – que pode variar de 0 (preto) a 100 (branco); a^* (que assume valores negativos (verde) ou positivos (vermelho)); e b^* (com valores negativos (azul) e positivos (amarelo)), sendo que os planos a^*b^* podem ocorrer em qualquer nível de L^* (**Figura 2.4**). Uma relação entre estas coordenadas leva ao grau de branco. O branco ideal é obtido quando a luminosidade (L^*) for igual a 100 e as coordenadas a^* e b^* forem iguais a 0. A diferença de cor (ΔE^*_{ab}) corresponde à distância entre uma amostra e a referência (ou padrão) neste espaço tridimensional.



Figura 2.4 – Espaço de cor CIELAB.

2.2.3.4. Determinação de pectina removida

O residual de pectina no tecido foi analisado pelo método do tingimento com azul de metileno (AM). As amostras de 7g foram tingidas com 0,6 mmol/L de AM em uma relação de banho de 1:50 durante 100 min. (1h e 40 min.) em um banho agitado a 70 °C. Foi realizada a determinação da Abs da solução do corante antes e depois do tingimento em espectrofotômetro a 663nm. Uma curva de calibração foi feita com as seguintes concentrações do corante: 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 mmol/L.

Este método baseia-se na interação estequiométrica entre o cátion do corante e o ânion do carboxilato da pectina, como ilustrado na **Figura 2.5**:

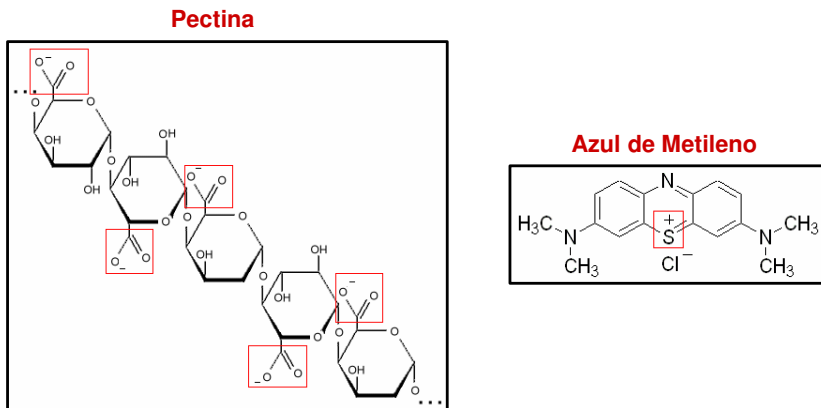


Figura 2.5 – Estruturas da pectina e do corante azul de metileno.

Quanto maior a quantidade de AM absorvido nas fibras, maior será o conteúdo de pectina, e portanto um azul mais escuro será obtido após o tingimento. Os tingimentos foram realizados com o tecido cru (considerado com 100% de pectina), com o tecido purgado alcalinamente (considerado com 0% de pectina) e com as amostras purgadas enzimaticamente conforme descrito por Wang *et al.*, 1998.

CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA PECTINASE

A pectinase alcalina comercial E.C. 4.2.2.2 foi caracterizada quanto a sua atividade em diferentes tempos de incubação, e na presença de agentes químicos e tensoativos normalmente utilizados em processos de purga alcalina e enzimática de tecidos de algodão. A quantificação de proteínas presentes nesta enzima, assim como a eletroforese para determinação de sua massa molecular, foram procedimentos também realizados nesta etapa.

3.1.1. Metodologia para determinação da atividade enzimática

Devido à falta de um consenso metodológico na literatura para o procedimento da determinação da atividade da pectinase, foi realizada uma adaptação a partir das metodologias encontradas.

Foi realizado primeiramente o acompanhamento da reação de eliminação da pectina cítrica (substrato padrão utilizado neste trabalho) com o tempo, utilizando a enzima pectinase E.C. 4.2.2.2, medindo-se os açúcares redutores que são liberados na reação, conforme metodologia definida em materiais e métodos item 2.2.1.1. Assim, utiliza-se a propriedade da pectina possuir açúcar redutor em sua composição, para o acompanhamento da reação.

O teor de açúcares redutores livres formados foi determinado pelo método do DNS (Miller, 1959), e a partir da construção de uma curva de calibração de glicose, foi possível a conversão dos valores de absorbância em concentração de AR (**Anexo III**). Para cada tempo de reação realizado na cinética, foi preparada uma curva de glicose, a qual foi incubada pelo mesmo tempo na mesma temperatura e pH.

Havendo, então, uma proporcionalidade entre a concentração de açúcares redutores e a absorbância medida, foi possível construir o gráfico da concentração de AR liberado em função do tempo (**Figura 3.1**).

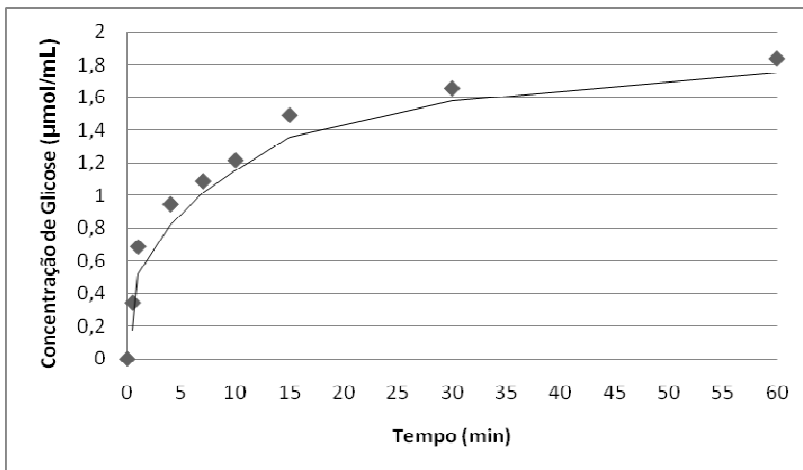


Figura 3.1 – Cinética da concentração de AR formado em função do tempo. Utilizando uma solução de 1mL/L da enzima pectinase incubada a 30 °C na presença de 0,25% (p/v) de pectina cítrica em 50 mM de tampão tris-HCl 30°C, pH 9,5.

Ao se medir a quantidade de produto formado em função do tempo, percebe-se através da **Figura 3.1**, que no início da reação a concentração de produto aumenta rapidamente e, após algum tempo, a velocidade de formação do produto diminui. Isso acontece porque a quantidade de reagente em solução diminui gradualmente, e deste modo a velocidade de reação, varia com o tempo, entretanto, nos tempos iniciais da reação, enquanto a concentração de substrato for muito grande, é possível encontrar uma relação linear de formação de produto com o tempo. Costuma-se associar a atividade da enzima com a medida da velocidade da reação em condição inicial, ou seja, aquela que assegura a velocidade constante e máxima.

Portanto, este estudo preliminar foi necessário para posteriormente saber em que intervalo de reação se deve determinar a atividade da enzima. Assim, de acordo com o perfil de velocidade mostrado na **Figura 3.1**, foi escolhido o tempo de 5 minutos para medida da atividade da pectinase. Este mesmo tempo de reação para determinação da atividade de uma pectinase também foi utilizado por Guebitz *et al.* (2006).

Através deste método do DNS foi possível também determinar a quantidade de açúcares redutores presentes no substrato padrão (pectina cítrica) utilizado nas reações catalisadas pela pectinase.

Para isto foram realizadas reações de 60 minutos com uma solução de 0,25% de pectina cítrica em 50mM de tampão tris-HCl pH 9,5 e 30°C e a pectinase com diferentes concentrações de enzima: uma solução concentrada (sem diluição), uma com 400mL/L e outra 100mL/L.

Após este tempo de reação o valor da absorbância nas três concentrações foi exatamente o mesmo e igual a 2,59. Isso indica que foi liberada a maior quantidade possível de AR na pectina cítrica, resultando em um valor de 99,1 mmol de AR por grama de pectina.

3.1.2. Atividade da pectinase

É importante que a enzima seja avaliada quanto à sua capacidade de catálise frente aos seus substratos padrões de atuação, baseando-se em sua atividade.

A atividade da pectinase foi medida primeiramente a 30°C e a pH 9,5, de acordo com o desenvolvimento do item 2.2.1.2. Foi também realizada, a medida a 55°C e pH 8,5, já que estas condições são sugeridas por alguns autores e de acordo com a ficha técnica fornecida juntamente com a enzima, estas são as melhores condições de ação da mesma. Estes resultados estão apresentados na **Tabela 3.1**.

A atividade pectinolítica foi determinada pela **Equação 3.1** e expressa em U/mL:

$$A = \frac{C_{AR} V_T D_E}{t_R V_E} \left[\frac{U}{mL} \right] \quad \text{ou} \quad \left[\frac{\mu mol}{mL \min} \right] \quad (\text{Eq. 3.1})$$

onde,

C_{AR} = concentração de açúcar redutor liberado [$\mu\text{mol}_{\text{glicose}}/\text{mL}$]

V_T = volume total da solução [mL]

D_E = diluição da enzima utilizada

t_R = tempo de reação [minutos]

V_E = volume da solução de enzima [mL]

Tabela 3.1 – Atividades específicas da pectinase

Enzima pectinase ^(a)	
Condições de T / pH	Atividade ^(b)
30°C / 9,5	952 U/mL
55°C / 8,5	2553 U/mL

(a) Solução de 1mL/L. (b) Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de pectinase necessária para produzir 1 μ mol de açúcar redutor por minuto.

O conhecimento da influência que o pH e a temperatura exercem na reação enzimática é de fundamental importância na otimização do processo de biopurga. Pode-se conhecer as limitações do processo e as faixas de pH e temperatura que maximizam a velocidade de quebra da pectina. Com base na literatura e nos resultados obtidos, os próximos teste foram então realizados a 55°C e pH 8,5.

3.1.3. Estabilidade da enzima com o tempo de incubação

A informação da estabilidade da enzima é de relevância para a otimização do processo de biopurga, pois não basta que a enzima tenha alta atividade a certa temperatura, mas que ela mantenha esta atividade durante todo o tempo de processo.

Foi avaliada a manutenção da capacidade da pectinase de catalisar reações quando mantida incubada até 24h à 55°C, conforme metodologia descrita em 2.2.1.3. Os resultados obtidos estão demonstrados na **Figura 3.2**.

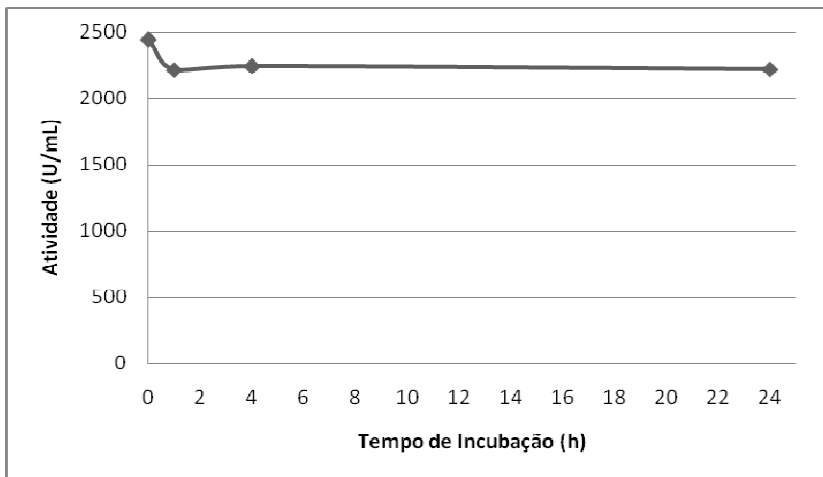


Figura 3.2 – Estabilidade da atividade da pectinase em função do tempo de incubação. A solução de 1mL/L de pectinase foi incubada até 24h a 55°C, e em cada tempo de incubação foi realizada a medida de atividade.

Os resultados mostram que durante a primeira hora de incubação da enzima há uma queda de 227 U/mL no valor de atividade, o que equivale a 11% de perda. Após este tempo a atividade foi mantida praticamente constante até 24h de incubação, indicando um bom resultado para bom para posterior utilização da enzima no processo de biopurga.

Apesar da estabilidade da enzima ser um ponto relevante para o processo, não há estudos de estabilidade para essa enzima dentro das principais referências.

3.1.4. Efeito dos agentes químicos na atividade da pectinase

Na indústria é imprescindível o uso de agentes surfactantes, que oferecem umectabilidade, conduzindo o substrato ao contato íntimo com as enzimas, assim como o uso de agentes sequestrantes, que removem os íons de metais presentes nas fibras.

A **Figura 3.3** ilustra como os agentes sequestrantes, normalmente utilizados nos processos de purga, enzimática e alcalina, influenciam na atividade da pectinase. Foram realizadas medidas de atividade apenas com o surfactante Triton X-100, e também deste com a

presença dos dois agentes sequestrantes utilizados neste trabalho (Quimerol 535 e EDTA), como descrito no item 2.2.1.4 da metodologia.

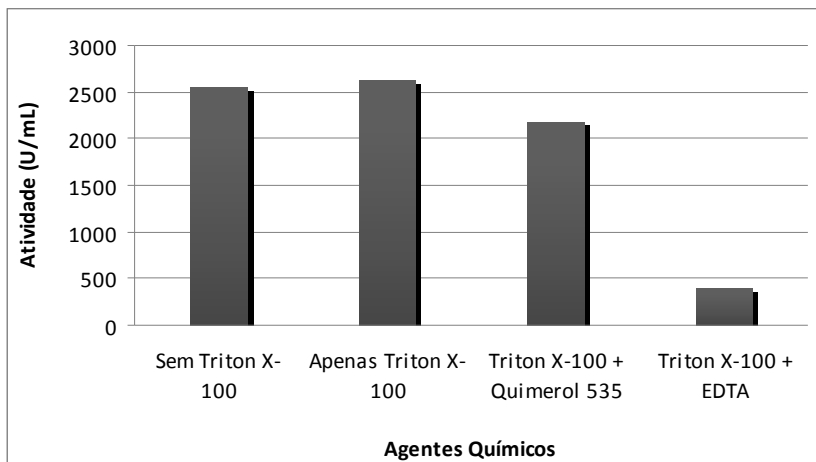


Figura 3.3 – Efeito dos agentes químicos na atividade da pectinase. Cada um destes produtos foram adicionados à solução de enzima na concentração de 1mL/L e deixados até atingirem 55°C, para então proceder nas medidas de atividade.

A atividade da pectinase com a presença apenas do surfactante Triton X-100 foi de 2629 U/mL.

Assim como reportado na literatura, o Triton X-100 é um surfactante usado em biopurga que não afeta a atividade da enzima pectinase. Agrawal (2005) mostrou em sua dissertação que o Triton X-100 é compatível com a enzima pectinase e melhora na efetividade da enzima para a superfície da pectina. Com a adição dos agentes sequestrantes, como se pode perceber na **Figura 3.3**, ao se utilizar o Quimerol 535, houve uma pequena queda no valor da atividade, resultando em 2180 U/mL, o que corresponde a uma diminuição de 17%. Este valor foi mantido durante 1h de incubação. Já o EDTA provocou uma grande queda no valor da atividade, obtendo um valor de 394 U/mL, o que corresponde a uma perda de 85%.

A disposição na literatura descreve algumas opiniões de cientistas sobre o efeito de agentes sequestrantes em pectinases, mostrando que estes podem ajudar bem na desagregação e remoção da pectina com pectinases ácidas, mas que o uso de quelantes com

pectinases alcalinas exige cautela. Em sua estrutura, as pectinases alcalinas (Bioprep 3000L) contém íons cálcio (Ca^{2+}) como elemento de ligação que mantém a estrutura tridimensional da enzima. Os quelantes fortes, tais como EDTA, podem extrair estes íons da estrutura, o que induz a desativação da enzima. (Tavčer e Preša, 2008).

É bem provável que o sequestrante Quimerol 535 seja mais fraco, impedindo uma mudança em sua estrutura o que não permite uma inibição.

3.1.5. Quantificação de proteínas e eletroforese

A determinação quantitativa de proteínas é indispensável durante o procedimento de caracterização das enzimas, além de ser necessário para posterior realização da eletroforese. A **Tabela 3.2** mostra os resultados de quantidade de proteína determinada pelo método de Lowry e da massa molecular da enzima determinada por eletroforese.

Tabela 3.2 – Quantificação de proteína e massa molecular da pectinase.

Pectinase	
Proteína total (mg/mL) ^(a)	67,5
Massa molecular (KDa) ^(b)	32,4

(a) Determinada pelo método de Lowry. (b) Determinada por eletroforese desnaturante SDS-PAGE.

O método de Lowry se baseia na reação do cobre com a proteína, em meio alcalino, e posteriormente redução do reagente de fosfomolibdato-fosfotungstenato no reagente folin. Quando o reagente folin é adicionado à proteína tratada com o cobre, ocorre a redução do reagente folin que resulta em uma cor mais intensa, com absorção máxima em 550 nm. A concentração de proteínas é determinada através de uma curva padrão previamente construída para a soroalbumina bovina (BSA). Através da curva de calibração foi obtido um valor de 67,5 mg de proteína por mL de enzima.

Para a eletroforese desnaturante descontínua, descrita pelo método de Laemmli, utilizou-se a proporção de 50 mg de proteína por 1

mL de amostra. Foi retirada uma alíquota com 50 mg de proteína que foi diluída no tampão de incubação, de forma a se obter a razão desejada de 50 mg/mL.

A massa molecular da pectinase foi determinada pela eletroforese desnaturante SDS-PAGE em gel homogêneo com 12,5% de poliacrilamida, e apresentou valor de 32,4 KDa.

Na **Figura 3.4** é apresentada uma foto do gel escaneado.

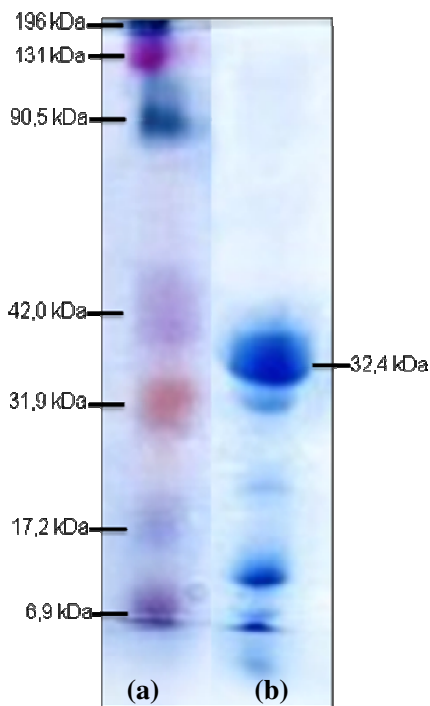


Figura 3.4 – Foto do gel após revelação mostrando as bandas das proteínas (a) Padrão de massa molecular (b) enzima concentrada.

Tabela 3.3 – Massa molecular das proteínas presentes no padrão.

Padrão de massa molecular	MM (kDa)	Log MM
Miosina	196,143	2,29257
β -galactosidase	131,064	2,11748
Bovina serum albumina	90,555	1,95691
Anidrase Carbonica	42,076	1,62403
Soybean trypsin inhibitor	31,931	1,50421
Lisosima	17,218	1,23598
Aprotinina	6,89	0,838219

Originalmente, o padrão de massa molecular contém sete proteínas diferentes, o que garante sete pontos para a curva (**Tabela 3.3**). Como pode-se perceber na **Figura 3.4** (b), a amostra da Bioprep 3000L apresentou várias bandas, que indicam a presença de outros tipos de proteínas. Uma destas bandas se mostrou mais forte do que as demais, ou seja, maior concentração daquela proteína, indicando a enzima pectinase.

Procedeu-se então com a construção do gráfico de log MM *versus* mobilidade (Rf) do padrão de massa molecular, para determinação da massa molecular das proteínas (**Anexo II, Figura A.1**). O resultado obtido para a mancha mais concentrada (pectinase) foi próximo do encontrado por Guebitz e seus colaboradores (2006) na análise de uma pectato liase de *Bacillus pumilus* BK2, o qual apresentou MM de $37,3 \pm 4,8$ kDa.

3.2. TRATAMENTOS DOS TECIDOS DE MALHA

Conforme definido na etapa de caracterização das enzimas deste trabalho, os processos de biopurga com a enzima pectinase foram realizados na temperatura de 55°C e pH 8,5. O surfactante utilizado em todos os processos foi o Triton X-100 e a concentração de enzima utilizada foi de 1000 U/g_{tecido}.

Deste modo, estes parâmetros foram determinados após os procedimentos de purga e biopurga nas amostras, sendo que as amostras

com características ideais devem apresentar hidrofiliidade instantânea, o maior grau de branco possível e pouca perda de massa.

3.2.1. Influência dos agentes sequestrantes nos processos de biopurga.

Foram avaliados dois processos de biopurga: um com a adição do agente sequestrante no após 30 minutos de tratamento enzimático (processo 1, **Figura 2.1** do item 2.2.2.1) e outro com adição no início do processo (processo 2, **Figura 2.2** do item 2.2.2.1). Para isso testou-se dois tipos de sequestrantes comerciais: EDTA e Quimerol 535.

Normalmente os agentes sequestrantes utilizados nos processos com tratamento enzimático, são adicionados no final do tratamento, após o tempo de biopurga estipulado, já que estes produtos muitas vezes interferem na atividade das enzimas.

Segundo Niaz e colaboradores (2009), a adição de agentes sequestrantes no início do processo removem os íons metálicos da estrutura da pectina e faz com que estas moléculas de pectina se tornem mais acessíveis ao ataque das pectinases.

3.2.1.1. Adição de sequestrantes após 30 minutos de tratamento enzimático.

A **Tabela 3.4** mostra os resultados obtidos para o processo 1:

Tabela 3.4 – Efeito dos sequestrantes no Processo 1*.

Ensaio	Quimerol 535 ^(b)	EDTA ^(c)
Perda de Massa (%) ^(a)	2,4 ± 0,1	2,1 ± 0,5
Hidrofiliidade (s) ^(a)	7,1 ± 0,6	7,8 ± 1,2
Grau de Branco (°Berger) ^(a)	13,9 ± 4,6	11,2 ± 2,8
Pectina removida (%)	57,7	54,8

* biopurga de tecido de malha 100% algodão cru com 1000U/g_{tec} de pectinase, pH 8,5, Temp. 55 °C, RB: 1:20 e adicionando-se os agentes sequestrantes após 30 minutos de tratamento enzimático. (a) realizados em triplicata. (b) e (c) 1mL/L.

Assim como ilustrado na **Figura 2.1**, os agentes sequestrantes foram adicionados após 30 minutos de tratamento enzimático e então foram deixados por mais 30 minutos.

Segundo os testes realizados na caracterização da pectinase, a adição de Quimerol 535 mostrou uma pequena redução na atividade da enzima. Portanto, após a adição deste sequestrante no processo houve uma diminuição também na concentração da enzima ativa, passando de $1000\text{U/g}_{\text{tec}}$ para $870\text{U/g}_{\text{tec}}$ e permanecendo nesta atividade nos próximos 30 minutos do processo. Isto indica que a enzima manteve sua atividade elevada durante 60 minutos. Já a adição de EDTA provocou uma grande queda na atividade da pectinase, sendo que a concentração da enzima passa para $160\text{U/g}_{\text{tec}}$ nos 30 minutos restantes do processo. Apesar disso, ao se comparar o uso do Quimerol com o EDTA, nota-se que não houve uma diferença significativa nos resultados de todos os ensaios (perda de massa, grau de branco, hidrofiliidade e pectina removida). Porém a pequena variação obtida indica que o uso do Quimerol 535 é mais favorável, promovendo um aumento no teor de pectina removida das fibras e conseqüentemente da perda de massa, além do aumento no branqueamento e um menor tempo de absorção de água.

Deste modo, seus efeitos foram investigados no processo 2.

3.2.1.2. Adição de sequestrantes no início do processo enzimático.

A **Tabela 3.5**, mostra os resultados obtidos para o processo 2:

Tabela 3.5 – Efeito do sequestrante no Processo 2*.

Ensaio	Quimerol 535 ^(b)	EDTA ^(c)
Perda de massa (%) ^(a)	$2,9 \pm 0,2$	$4,1 \pm 1,3$
Hidrofiliidade (s) ^(a)	$7,3 \pm 0,4$	$10,2 \pm 2,0$
Grau de branco (°Berger) ^(a)	$19,5 \pm 1,5$	$17,8 \pm 0,7$
Pectina removida (%)	60,1	41,2

* biopurga de tecido de malha 100% algodão cru com $1000\text{U/g}_{\text{tec}}$ de pectinase, pH 8,5, Temp. 55 °C, RB: 1:20 e adicionando-se os agentes sequestrantes no início do tratamento enzimático. (a) realizados em triplicata. (b) e (c) 1mL/L.

Neste processo o agente sequestrante foi colocado no início do processo juntamente com todos os outros produtos químicos e com a enzima, onde permaneceram durante apenas 30 minutos. Analisando a **Tabela 3.5** percebe-se que o uso do Quimerol 535 apresentou melhores resultados em todos os quesitos analisados.

Como já explicado, a presença de EDTA diminuiu significativamente o valor da atividade da pectinase, e neste caso, o seu uso no início do processo juntamente com a enzima, acabou por piorar os resultados dos ensaios. Houve diminuição de aproximadamente 20% no valor da quantidade de pectina removida do tecido, em relação ao uso do Quimerol. Como consequência, houve também um aumento no tempo de absorção de água. Em relação ao grau de branqueamento dos tecidos, não houve diferença significativa, assim como o ensaio de perda de massa, que apresentou um grande desvio, quando se usa o EDTA.

3.2.1.3. Comparação entre os processos de biopurga (processos 1 e 2).

Para uma melhor visualização, os resultados de ambos os processos estão descritos na **Tabela 3.6**.

Tabela 3.6 – Comparação entre os resultados dos ensaios obtidos após os processos de biopurga testado (processos 1 e 2)*

	Ensaio	Quimerol 535 ^(b)	EDTA ^(c)
Processo 1	Perda de massa (%) ^(a)	2,4 ± 0,1	2,1 ± 0,5
	Hidrofilidade (s) ^(a)	7,1 ± 0,6	7,8 ± 1,2
	Grau de branco (°Berger) ^(a)	13,9 ± 4,6	11,2 ± 2,8
	Pectina removida (%) ^(a)	57,7	54,8
Processo 2	Perda de massa (%) ^(a)	2,9 ± 0,2	4,1 ± 1,3
	Hidrofilidade (s) ^(a)	7,3 ± 0,4	10,2 ± 2,0
	Grau de branco (°Berger) ^(a)	19,5 ± 1,5	17,8 ± 0,7
	Pectina removida (%) ^(a)	60,1	41,2

* biopurgas de tecido de malha 100% algodão cru com 1000U/g_{tec} de pectinase, pH 8,5, Temp. 55 °C, RB: 1:20 com adição dos agentes sequestrantes após 30 minutos de tratamento enzimático (processo1) e com adição dos agentes sequestrante no início do tratamento enzimático (processo 2). (a) realizados em triplicata. (b) e (c) 1mL/L.

É importante ressaltar que o uso de Quimerol 535 mostrou-se mais eficiente na remoção de pectina do que em relação ao uso de EDTA nos dois processos (processos 1 e 2), sendo que o maior valor foi de 60,1% de pectina removida ao se utilizar Quimerol no início do processo.

O tempo de ação dos sequestrantes foi o mesmo nos dois processos, e ao se analisar o efeito do EDTA, em ambos os processos, percebe-se que houve grande variabilidade nos resultados de perda de massa.

O uso de Quimerol no início do processo (processo 2) não apresentou diferenças significativas nos valores de todos os ensaios ao se comparar com os com sua adição no intervalo (processo 1). Portanto o uso do processo 2 torna-se vantajoso devido ao menor tempo de processo e também à praticidade de se adicionar todos os produtos juntos, ou seja, 30 minutos de purga é o suficiente.

3.2.2. Tratamento das amostras de tecido sem adição de enzima.

Já que o uso de sequestrante no início do processo (processo 2) foi considerado como melhor resultado, este foi utilizado para testes de tratamento do tecido com a adição do sequestrante EDTA, porém sem a adição de enzima.

Tabela 3.7 – Efeito do tratamento do tecido sem adição de enzima.

Ensaio	EDTA ^(b)
Perda de massa (%) ^(a)	3,9 ± 0,1
Hidrofilidade (s) ^(a)	12,6 ± 1,2
Grau de branco (°Berger) ^(a)	22,7 ± 1,3
Pectina removida (%)	0

tratamento de tecido de malha 100% algodão cru, pH 8,5, Temp. 55 °C, RB: 1:20 e adicionando-se os agentes sequestrantes no início do tratamento enzimático. (a) realizados em triplicata. (b) 1mL/L.

Estes resultados indicaram que não houve remoção de pectina do tecido já que o tingimento com azul de metileno apresentou a mesma absorção do corante em relação ao tecido sem nenhum tratamento. Apesar da não remoção de pectina, houve uma perda de massa de 3,9% ± 0,1, o que confirma o fato de o EDTA interferir fortemente na remoção de íons das fibras. Porém para confirmação destes fatos o ideal seria a realização de testes de grau de dureza nas amostras de tecidos assim como uma microscopia eletrônica de varredura (MEV) para verificar se houve realmente a remoção dos piolhos e algum tipo de degradação das fibras.

Este processo de lavagem resultou também num aumento no tempo de absorção de água, que ocorreu em 12,6 segundos. Isto provavelmente está relacionado com a pectina não removida das fibras. Entretanto houve um aumento no índice de branqueamento durante o tratamento dos tecidos sem adição de enzima (grau de branco = 22,7 °Berger).

Este fato talvez possa ser explicado devido a pectinase apresentar uma coloração marrom escura, e como a enzima penetra no tecido, mesmo após a lavagem isso pode estar interferindo em uma coloração mais escura.

Nas amostras cruas (sem tratamento) os ensaios de hidrofiliidade não apresentaram absorção de água, e o grau de branco foi de -1,7 °Berger.

3.2.3. Purga alcalina

Para comparação dos resultados dos ensaios foi realizada também uma purga alcalina e com base nos resultados obtidos no estudo da influência dos agentes sequestrantes, foi escolhido então o Quimerol 535 para ser utilizado neste processo.

A purga alcalina foi realizada nas condições normalmente utilizadas pela indústria, como mostrado anteriormente na **Figura 2.3**. A **Tabela 3.8** mostra os resultados obtidos.

Tabela 3.8 – Resultados dos ensaios após tratamento alcalino dos tecidos.

Purga alcalina*	
Ensaio	Resultados
Perda de massa (%) ^(a)	5,2 ± 2,8
Hidrofiliidade (s) ^(a)	9,1 ± 0,7
Grado de branco (°Berger) ^(a)	31,5 ± 4,1
Pectina removida (%) ^(a)	100 ^(b)

* tratamento de tecido de malha 100% algodão cru durante 30 minutos em 5g/L de NaOH a 90 °C, e RB: 1:20. (a) realizados em triplicata. (b) valor considerado pela metodologia do azul de metileno.

A discussão dos resultados obtidos para a purga alcalina dos tecidos foi feita em seguida por comparação deste processo com os

demais realizados neste trabalho, com base nos ensaios de perda de massa, hidrofiliidade, grau de branco e teor de pectina.

- **Perda de massa**

O resultado indicado na perda de massa dos tecidos purgados alcalinamente (5,25%) se mostra com uma porcentagem maior em relação aos tecidos biopurgados. Este resultado está em concordância com a literatura, indicando que provavelmente o hidróxido de sódio combinado a alta temperatura acarreta em uma condição mais agressiva, removendo completamente as impurezas da fibra e parte da própria fibra por degradação (Buschle-Diller *et al.* 1998).

- **Residual de pectina**

De acordo com a metodologia utilizada de tingimento com azul de metileno, a amostra tingida após a purga alcalina se apresentou visivelmente mais clara em relação às biopurgadas, e serve como padrão indicando a remoção completa de pectina. A amostra sem nenhum tratamento obteve o azul mais intenso de todos, indicando maior quantidade de pectina presente nas amostras. As amostras biopurgada, que conforme discutido neste trabalho apresentaram remoção de pectina entre 40 e 60%, indicaram coloração intermediária entre a purga alcalina e o tecido cru (**Figura 3.5**). Portanto este método se mostrou eficaz para determinação do residual de pectina no tecido.



Figura 3.5 – Fotografia das amostras de tecido tingidas com azul de metileno.

- **Ensaio de hidrofildade**

Em relação aos ensaios de hidrofildade podemos analisar a **Figura 3.6** abaixo:

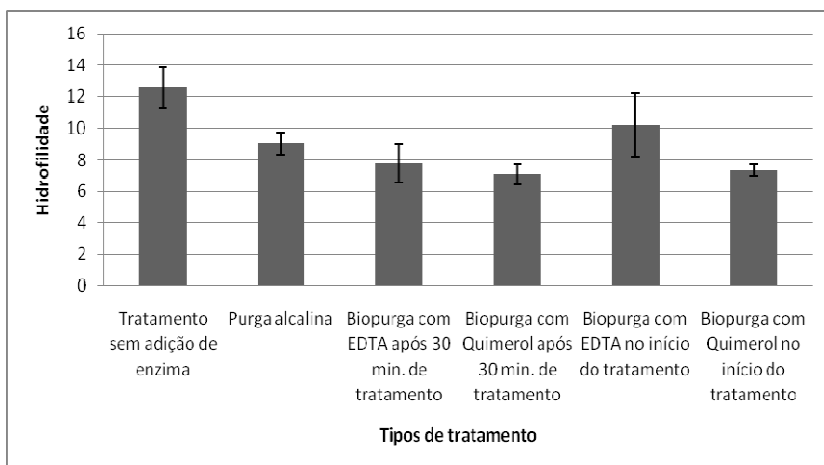


Figura 3.6 – Resultados dos ensaios de hidrofildade para os processos de tratamento testados. Ensaio realizado a $Temp\ ^\circ C = 20 \pm 2$ e $UR\ (\%) = 65 \pm 4$.

Esta figura mostra que o maior valor de hidrofiliidade foi obtido para o tratamento dos tecidos sem a adição da enzima, ou seja, apresentou a pior absorção de água, com um tempo de 12,6 s. Os tecidos biopurgados (com exceção de quando se usa EDTA no início do processo) apresentaram resultados levemente melhores (com hidrofiliidade dentro dos 7 segundos) ao se comparar com o purgado alcalinamente (9,1s), indicando que não houve variação significativa na absorção de água.

O tecido sem tratamento não apresentou absorção de água.

- **Grau de branco**

Os ensaios de grau de branco, ilustrados na **Figura 3.7**, demonstram que o tecido purgado alcalinamente apresentou o maior índice de branqueamento em relação aos tecidos biopurgados.

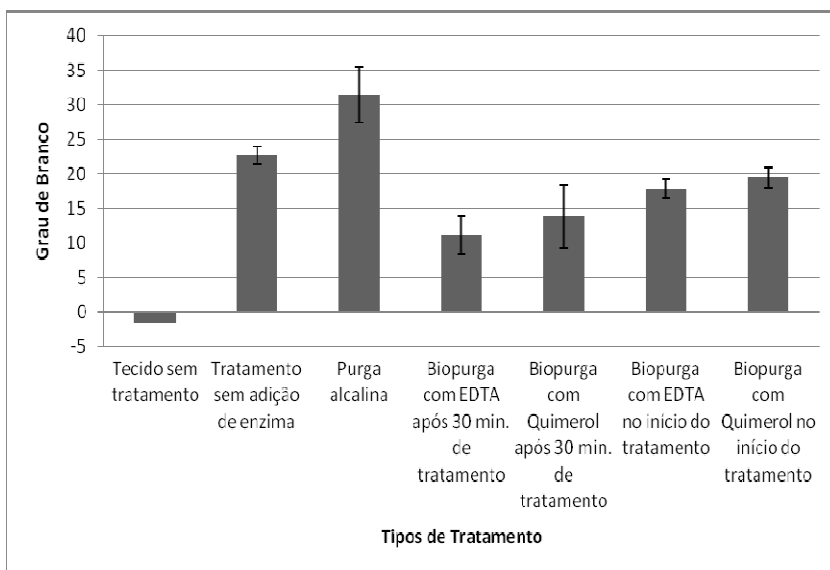


Figura 3.7 – Resultados dos ensaios de grau de branco para os processos de tratamento testados. Ensaio realizado a $Temp\ ^\circ C = 20 \pm 2$ e $UR\ (\%) = 65 \pm 4$.

Este resultado pode ser explicado novamente devido às condições do tratamento alcalino serem mais agressivas às fibras, removendo com maior eficiência todas as impurezas, que conferem um aspecto amarelado ao tecido.

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 da sua luminosidade quanto da sua tonalidade. A **Tabela 3.9** apresenta o grau de branco e as coordenadas colorimétricas conferidas às amostras pelos tratamentos de purga enzimática, alcalina, pela amostra sem tratamento (crua) e sem enzima.

Tabela 3.9 – Grau de branco e coordenadas de cor conferidas às amostras conforme o tipo de processo.

Tipo de Processo	Dados				Grau de Branco
	\bar{L}	\bar{a}^*	\bar{b}^*	\bar{C}^*	
Amostra crua ^(a)	86,4	2,2	14,3	14,5	-1,7 ± 0,2
Tratamento sem adição de enzima ^(b)	89,8	1,3	11,0	11,1	22,7 ± 1,3
Purga alcalina ^(c)	90,7	1,0	9,7	9,7	31,5 ± 4,1
Processo 1 – Quimerol 535 ^(d)	87,4	1,6	11,6	11,7	13,9 ± 4,6
Processo 1 – EDTA ^(e)	86,7	1,9	12,3	12,5	11,2 ± 2,8
Processo 2 – Quimerol 535 ^(f)	88,2	1,6	10,8	11,0	19,5 ± 1,5
Processo 2 – EDTA ^(g)	88,5	1,7	11,4	11,5	17,8 ± 0,6

Leituras de grau de branco em Espectrofotômetro (Método Ganz). Ensaio realizado em ambiente à temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e UR (%) = 65 ± 2 . (a) sem tratamento (b) com sequestrante EDTA 1g/L. (c) com 5g/L de NaOH; (d) com 1g/L de Quimerol 535 adicionado após 30 minutos de tratamento enzimático. (e) com 1g/L de EDTA adicionado após 30 min. De tratamento enzimático. (f) com 1g/L de Quimerol adicionado

no início do processo. (g) com 1g/L de EDTA adicionado no início do processo.

Observa-se que todos os processos de purga aumentaram a luminosidade das amostras em relação a amostra crua (sem tratamento), e que o maior valor foi alcançado pela purga alcalina. Dentre os valores de croma obtidos, o mais relevante para análise foi o b^* que vai do $-b^*$ a $+b^*$ (azul-amarelo), pois a cor azul confere aspecto limpo e a cor amarela, aspecto sujo. Esta coordenada b^* é importante pois possui um relação direta com o valor do grau de branco, como mostra a **Figura 3.8**:

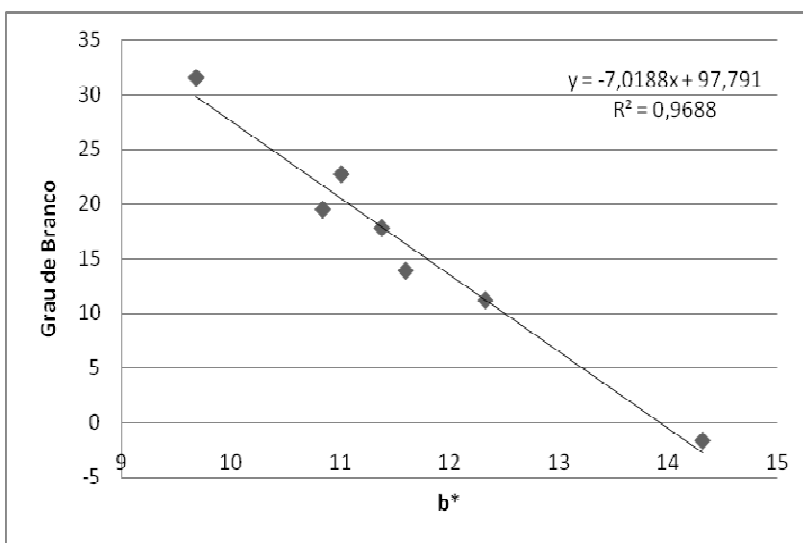


Figura 3.8 – Gráfico do grau de branco em função da coordenada colorimétrica b^* .

Portanto há uma relação linear, indicando que quanto maior o grau de branco, menor o valor de b^* , caminhando para a cor azul, que indica aspecto mais limpo.

Assim, a amostra crua apresentou croma $+b^* = 14,3$, 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 $+b^* = 9,7$, um valor mais próximo do azul, e conseqüentemente um aspecto mais limpo. Dentre os processos de biopurga utilizados, os resultados mostraram que não houve variação significativa em seus valores de grau de branco. Visando

a obtenção de um melhor resultado de branqueamento, pode-se realizar testes aumentando a concentração do surfactante. Segundo descrito na tese de Freitas (2008), há uma relação entre a concentração dos surfactantes com o grau de branco, e o aumento da concentração de surfactante aumenta o grau de branco de amostras biopurgadas.

3.2.4. Avaliação da influência do ultrassom no processo de biopurga.

Há relatos na literatura que o ultrassom facilitaria os processos de absorção, limpeza e outras interações (Karaboğa *et al.*, 2007).

A partir do melhor resultado de biopurga obtido (adicionando-se o Quimerol 535 no início do processo) visando melhorar ainda mais este resultado, realizou-se a biopurga com pectinase no aparelho de ultrassom. Os resultados apresentados na **Tabela 3.10** comparam o processo realizado no ultrassom com o mesmo processo realizado no equipamento Mathis.

Tabela 3.10 – Comparação das biopurgas realizadas em ultrassom e no aparelho para tingimento Mathis.

Ensaio	Ultrassom	Mathis
Perda de massa (%)*	3,3 ± 0,04	2,9 ± 0,2
Hidrofilidade (s)*	12,9 ± 2,6	7,3 ± 0,4
Grau de branco*	18,6 ± 1,0	19,5 ± 1,5
Pectina removida(%)	53,0	60,1

* Realizados em triplicata. Biopurga de tecido de malha 100% algodão cru realizado de acordo com o processo 2 (onde o sequestrante é adicionado no início do tratamento enzimático, com 1g/L de Quimerol 535, 1000U/g_{tec} de pectinase, pH 8,5, Temp. 55 °C, RB: 1:20)

Percebe-se que, na biopurga realizada em aparelho de ultrassom, houve diminuição no teor de pectina removida, apesar de indicar maior perda de massa. Porém o tempo de absorção de água aumentou significativamente e não houve mudança no branqueamento. Portanto, os resultados não indicaram melhoria significativa ao se utilizar o ultrassom para realização da biopurga.

CONCLUSÕES

As principais conclusões deste estudo podem ser resumidas nos seguintes pontos:

Na etapa de caracterização da pectinase alcalina Bioprep 3000L, concluiu-se que esta enzima apresentou uma maior atividade a 55°C e pH 8,5 permanecendo estável nestas condições e também com a adição do agente surfactante Triton X-100.

A presença do Triton X-100 juntamente com o agente sequestrante Quimerol 535 no meio, não afetou muito sua estabilidade, resultando em uma pequena diminuição (17%) na atividade da pectinase. Entretanto com a presença do sequestrante EDTA no meio, a enzima sofreu um grande efeito inibitório, o que resultou numa diminuição de 85% na sua atividade.

Na etapa de tratamento dos tecidos, a comparação das propriedades dos tecidos biopurgados nos dois processos testado e utilizando-se os dois agentes sequestrantes, mostraram que o uso do Quimerol 535 no início do processo (processo 2) apresentou melhoria no grau de branco, e o uso do EDTA, neste mesmo processo, apresentou uma maior perda de massa. Porém não houve diferenças significativas em relação aos demais ensaios. Portanto a adição do agente sequestrante no início do processo de biopurga (processo 2) apresentou-se mais viável do que a adição após 30 minutos de tratamento enzimático (processo 1), quando se usa o quimerol 535, devido a praticidade de se adicionar todos os produtos juntos e também pelo menor tempo de tratamento).

Ao se realizar este mesmo processo (processo 2) em aparelho de ultrassom, não houve melhoria significativa dos resultados.

A utilização desta enzima ainda contribui com outras vantagens, como a não degradação das fibras, não cooperação para a poluição dos efluentes, além da economia de energia devido à menor temperatura de processo.

Apesar de os tecidos biopurgados não terem alcançado o grau de branqueamento e a quantidade de pectina removida obtidos na purga convencional alcalina, os testes de hidrofiliabilidade apresentaram-se com diferenças insignificantes, o que garante que o tecido se tornou hidrofílico e apto a seguir para as próximas etapas do beneficiamento.

Portanto, a pectato liase Bioprep 3000L se mostrou uma enzima potencial para ser empregada em um processo de biopurga industrial, e que sua utilização pode ser tão eficaz quanto o processo alcalino convencional

PERSPECTIVAS

A fim de melhorar os resultados da biopurga de tecidos de malha de algodão pretende-se:

- Testar a enzima pectinase alcalina em adição conjunta das enzimas celulase e lipase, e avaliar seus efeitos também individualmente, avaliando a melhor sequência de adição destas enzimas no processo de biopurga de amostras de tecidos.
- Avaliar a influência do tempo de processo na biopurga.
- A partir dos melhores resultados obtidos, serão realizados experimentos de biopurga diminuindo-se a concentração das diversas enzimas estudadas e verificando-se como esta concentração influencia nos objetivos da biopurga. Pretende-se com isto melhorar o processo do ponto de vista econômico.
- Testar o reuso do caldo enzimático do processo de biopurga desenvolvido.
- Ampliar a escala do processo de biopurga desenvolvido para a escala piloto.
- Analisar as características do efluente gerado após o processo de biopurga e investigar seu efeito no meio ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, P. B. The performance of cutinase and pectinase in cotton scouring. **Dissertation**, University of Twente, the Netherlands, 2005.

ALY, A. S.; MOUSTAFA, A. B.; HEBEISH, A. Bio-technological treatment of cellulosic textiles. **J. Clean Prod.**, v. 12, p. 697–705, 2004.

ARAÚJO, M.; MELO E CASTRO, E. M. **Manual de Engenharia têxtil**. Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, p. 744-745, 1984.

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

BUCHERT, J.; J. PERE, “Scouring of cotton with pectinases, proteases and lipases”, **Textile Chemist and Colorist & American Dyestuff Reporter**, p. 48-52, 2000.

BUSCHLE-DILLER, G.; TRAORE, M. K. Influence of direct and reactive dyes on The enzymatic hydrolysis of cotton. **Text. Res.**, v. 68, p.185–192, 1998.

CSISZAR, E.; LOSONCZI, A.; SZAKACS, G.; RUSZNAK, I.; BEZU, R. L.; REICHER, J. Enzymes and chelating agent in cotton pretreatment. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 271–279, 2001.

FREITAS, K. R. Estabilização enzimática para aplicação em biopurga de tecidos de malhas de algodão. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

GAMA, P. F. M. Mecanismo bioquímico da acção de celulasas de *Trichoderma reesei*. **Dissertação de Doutoramento**. Departamento de Engenharia Biológica, Escola de Engenharia, Universidade do Minho, 1996.

GERHARTZ, W. **Enzymes in Industry**. Production and Applications edited by Wolfgang Ahle, second edition, 2004.

GÜBITZ, G. M. Dept. Environmental Biotechnology, Graz University Technology. 2001. Tradução e adaptação: Amílcar D´Avila de Mello (Vice Versa Traduções Ltda.), Jürgen Andreaus FURB, Dept. de Química.

GUEBITZ, G. M.; KLUG-SANTNER, B. G.; SCHNITZHOFFER W.; VRSANSKÁ M.; WEBER J.; AGRAWAL P. B.; NIERSTRASZ V. A. Purification and characterization of a new bioscouring pectate lyase from *Bacillus pumilus* BK2. **J. Biotechnol**, v. 121, p. 390–401, 2006.

GUPTA, R.; JAYANI, R.S.; SAXENA, S. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochem**. v. 40, p.2931–2944, 2005.

HARDIN, I.R.; LI, Y. Enzymatic scouring of cotton: effects on structure and properties, **Textile Chemist and Colorist**, v. 8, p. 71-76, 1997.

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

KARABOĞA, C.; KÖRLÜ, A. E.; DURAN K.; BAHTIYARI, M. İ. Use of ultrasonic technology in enzymatic pretreatment processes of cotton fabrics. **Fibres & Textiles** v. 15, n.4, p. 97-100, 2007.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Appl. Sci.** London, p.217-225, 2000.

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

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

LEHNINGER, N.; D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**, 3 ed USA, Saunders Publishing College, 2000.

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

LIN, C-H.; HSIEH, Y-L., Direct scouring of greige cotton fabric with proteases, **Textile Research Journal**, v. 5, p. 415-434, 2001.

LOSONCZI, A. K. **Bioscouring of cotton fabrics**. Ph.D. Thesis, Budapest University of Technology and Economics, 2004.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; LEWIS FARR, A.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. Department of Pharmacology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, 1951.

MALLER, A. Produção, Purificação e Caracterização do Complexo Pectinolítico do Fungo *Aspergillus niveus*. **Dissertação de mestrado**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, 2008.

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

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

ANIAZ, A.; ADNANTARIQ; MUDASSIR, M. A. R.; SHEIKH, N.; ASLAM, A.; ISHAQ S. Bioscouring of cellulosic textiles. College of Textile & Polymer Engineering, Korangi, Karachi. **Pakistan Textile Journal**, p.43-45, 2009.

SHORE, J. Cellulosics Dyeing. **Society of Dyers and Colourists**. p. 2-5 e 14-24, 1995.

SILVA, R. J. M. Tratamento de Fibras Têxteis com Ultra-Sons e Enzimas. **Dissertação de Mestrado**, Universidade do Minho, 2006.

SOLOMONS, T. W. G. **Química Orgânica** - 6ª Edição, Editora Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, Brasil, v. 2, p. 388-393, 1996.

TAVČER, P. F.; PREŠA, P. Bioscouring and bleaching of cotton with pectinase enzyme and peracetic acid in one bath. **Coloration Technol**, v. 124, p. 36 – 42, 2008.

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.

UENOJO M. PASTORE G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

UENOJO M.; PASTORE G. M. Pectinases:aplicações industriais e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

UIEARA, M., **Química Orgânica e Biológica**, Universidade Federal de Santa Catarina, p. 106, 2001.

WANG, X. Y.; SAWADA, K.; TOKINO, S.; UEDA, M. Bioscouring of cotton with pectinase enzyme. **J. Soc. Dyers Colour**, v. 114, n. 11, p. 333-336, 1998.

YADAV, S.; YADAV, P. K.; YADAV D.; YADAV, K. D. S. Pectin lyase: A review. **Process Biochem**, 2008

ANEXO I

Método de Lowry para determinação da quantidade de proteína na pectinase

Parte experimental

- Reativo A: 2g de Na_2CO_3 seco + 0,02g de tartarato duplo de sódio e potássio em 100 mL de NaOH 0,1M
- Reativo B: 0,5g de CuSO_4 + 2 gotas de H_2SO_4 concentrado em 100 mL de H_2O
- Solução AB: 50 mL de reativo A com 1mL de reativo B. Preparar imediatamente antes da dosagem.
- Reativo de Folin: Solução 1N, conservar ao abrigo da luz.
- Solução padrão de soro albumina bovina (BSA) 100mg/L: 10 mg de BSA em 100mL de NaOH 0,1M. Adicionar cuidadosamente a solução de BSA p/ evitar formação de bolhas. Conservar sobre refrigeração.

Dosagem:

1. 1mL de solução de proteína (tabela)
2. 3mL de solução AB. Cobrir com parafilme. Agitar por 5 min. Em banho de ultrasom e deixar em repouso durante 10 minutos precisos ao abrigo da luz.
3. Adicionar 0,3 mL de reativo de Folin 1N. Cobrir com parafilme. Agitar por mais 5 min no ultrasom e deixar em repouso por 30 min ao abrigo da luz, e então medir a absorbância num comprimento de onda de 760nm.

Tabela A.1 – Concentrações de BSA em solução de NaOH.

BSA mg/L	Volume BSA	Volume NaOH 0,1M
0	0	4,0
10	0,4	3,6
30	1,2	2,8
50	2,0	2,0
80	3,2	0,8
100	4,0	0

Volume total de 4 mL para triplicata.

ANEXO II

Metodologia de eletroforese em condições desnaturantes (sds-page)

Preparo dos reagentes

- **Solução de Acrilamida / Bis-(Acrilamida)**

A cada 100 ml de solução, foi dissolver 29,10 g de acrilamida e 0,90 g de Bis-(acrilamida), completando o volume com água miliQ a quente até completar o volume. Isto para garantir que a solução final contenha uma concentração de 291 (g acrilamida)/l de solução e 9 (g bis-(acrilamida))/l de solução. a solução foi armazenada em um frasco âmbar a 4°C.

- **Solução de Persulfato de Amônio (APS 10%)**

A solução de persulfato de amônio foi preparada no momento do uso, para que a mesma não perca sua eficiência enquanto armazenada. Deve conter uma concentração de 10%, desta forma para um volume de 1 ml de solução, o qual foi necessário para o experimento, foi dissolvido 0,1 g de APS e o volume foi completo com água miliQ.

- **Solução tampão para a formação do gel de fracionamento ou separação (tris-hcl 1,5 m, ph 8,8)**

Foi preparada para um volume de 500 ml, para tanto, 90,84g de Tris-base foram dissolvidos em 300 ml de água miliQ. Após este procedimento o pH da solução foi ajustado com ácido clorídrico (HCl) para que chegue a 8,8 e em seguida o volume ajustado com água miliQ até 500 ml e homogeneizado. Este tampão foi armazenado a 4°C.

- **Solução tampão para a formação do gel de concentração ou empilhamento (Tris-HCl 1 M, pH 6,8)**

Foi preparado 500 mL de solução. Para isso, 60,56 g de Tris-base foram dissolvidos em 350 mL de água miliQ. O pH foi ajustado para 6,8, com HCl. O volume foi completado com água miliQ. A armazenagem também foi feita a 4°C.

- **Solução tampão para a “corrida” eletroforética (pH 8,3)**

No preparo de um litro de solução, foi dissolvido 15,00 g de Tris-base, 72,00 g de glicina e 5,00 g de SDS em 700 mL de água miliQ. Após a dissolução dos reagentes foi realizado o ajuste do pH para 8,3 com HCl e em seguida o volume foi completado com água miliQ e a solução homogeneizada. A solução tampão foi armazenada a 4°C.

- **Solução tampão da amostra (mistura de incubação)**

Na Tabela A.2 estão listadas as soluções-reagentes, juntamente com suas proporções, utilizados na preparação do tampão da amostra para um volume de 25 ml, que foi armazenado a uma temperatura de 4°C.

Tabela A.2 - Soluções-reagentes utilizados na preparação da solução tampão da amostra.

Volume (mL)	Solução
5,0	SDS 10%
5,0	Glicerol
0,5	□-mercaptoetanol
2,5	Azul de bromo fenol (ABF) 0,05%
2,5	Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8
Completar o volume com água miliQ	

- **Solução corante – coomassie blue (CBR-250) 1%**

Para tanto 5g de CBR-250 foi dissolvido numa mistura de 45% de metanol, 10% de ácido acético e 45% de água miliQ. Foi preparado 500 mL de solução. Este corante pode ser armazenado e não necessita de refrigeração.

- **Solução descorante**

Esta solução é composta por 45% de metanol 10% de ácido acético glacial e 45% de água miliQ. Para o preparo de 500 ml de solução, 225 ml de metanol, 50 ml de ácido acético glacial e 225 de água miliQ.

Preparo dos géis

A partir das soluções-reagentes, foram preparados os géis a serem utilizados na eletroforese, de acordo com a **Tabela A.3**.

Tabela A.3 - Reagentes para a preparação do gel de Poliacrilamida.

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

* Produz um gel de (20 x 20) cm²

Antes de preparar as amostras foi necessário realizar a quantificação de proteínas totais ali contidas, de modo a se escolher o melhor método de revelação. As amostras analisadas foram preparadas a fim de obter-se uma concentração final de 50 mg de proteína para cada 1 ml de amostra, para tal as mesmas foram diluídas com a solução tampão de amostra apresentada na **Tabela A.2**. Posteriormente a adição do tampão de amostra fez-se a desnaturação a 95°C por 5 minutos.

Metodologia utilizada

A limpeza das peças da cuba eletroforética foi feita com etanol 70%, para remover quaisquer substâncias orgânicas ali presentes, de modo a não interferirem na análise. Após a limpeza o módulo central de corrida foi posicionado no “casting base” e fixado.

As soluções, de resolução e de concentração foram preparadas, sem adicionar o TEMED, de acordo com as quantidades indicadas. Em seguida foi adicionado à solução do gel de resolução, o agente polimerizante TEMED. A solução foi agitada vigorosamente e colocada imediatamente, com o auxílio de uma micropipeta, entre as placas de vidro, com o cuidado de evitar a formação de bolhas de ar. A solução foi colocada até a marca traçada previamente. Foi adicionada um pouco de água miliQ sobre a superfície do gel de resolução (a água miliQ evita que a superfície de polimerização fique irregular e ressecada). Foi deixado um pouco da solução do gel no béquer para verificar a polimerização (aproximadamente 30 minutos). Quando o gel estiver polimerizado, remover a água da superfície do gel foi removida.

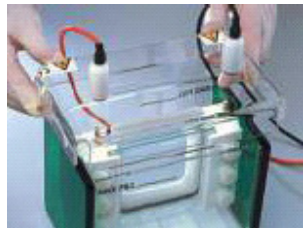
O TEMED foi adicionado à solução do gel concentrador que em seguida foi introduzida entre as placas logo acima do gel de separação. Encaixou-se o pente com o tamanho de poço desejado entre as placas e até o gel concentrador foi deixado em repouso até polimerizar (aproximadamente 30 minutos). Após o gel ter polimerizado, o pente foi retirado posicionando-o de forma que não danifique os poços do gel concentrador. Com o auxílio de uma micropipeta, os poços que ficaram deformados foram lavados com tampão de eletroforese para



arruma-los.

Liberou-se o módulo do “casting base” e encaixou-o no tanque. Colocou-se as amostras e os padrões moleculares nos poços do gel de concentração, em seguida a solução tampão e encaixou-se a tampa. Com o auxílio de uma seringa, as bolhas de ar que se formaram entre as placas de vidro foram removidas no limite inferior do gel. (Por convenção, o preto é o pólo negativo e o vermelho é o pólo positivo - as proteínas vão migrar para o pólo positivo).

A fonte então foi ligada para a corrida. Iniciou-se a eletroforese aplicando uma voltagem menor (80 V) até a frente de corrida atingir o gel de migração, e então, aumentou-se a voltagem para 125V. Quando a migração da pirronina atingiu o fim do gel de resolução, a fonte foi desligada. Retirou-se a tampa da câmara, despejou-se a solução de eletroforese e removeu-se o gel, para ser corado.



O gel foi colocado cuidadosamente num recipiente contendo solução corante Coomassie, o qual ficou corando por uma noite, aproximadamente 16 horas, e logo após, mergulhado em uma solução para descorar onde permaneceu por cerca de 3 horas até se observar nitidamente as bandas correspondentes às várias proteínas. Após estas etapas de revelação, o gel foi acondicionado entre duas folhas de papel celofane vedadas as extremidades, com objetivo de evitar que o mesmo resseque. Em seguida, foi fotografado e escaneado.

Após escanear, procedeu-se ao cálculo das mobilidades relativas (R_f) sendo que, com os padrões de pesos moleculares, foi possível construir a curva-padrão (**Figura A.1**)

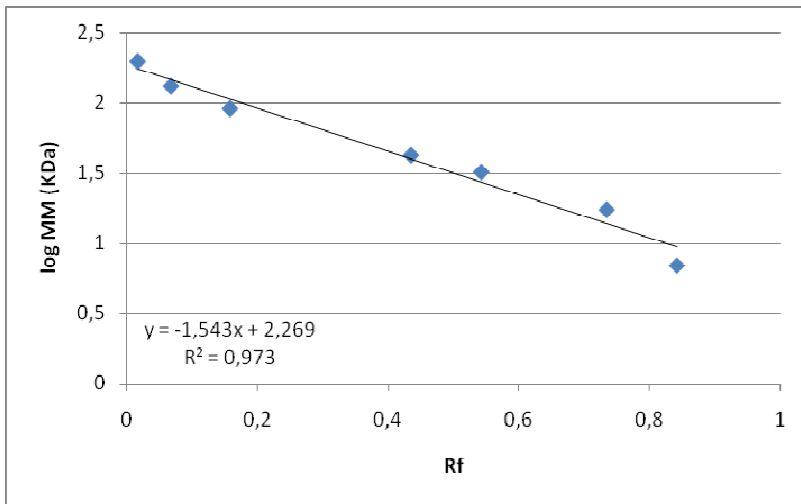


Figura A.1 – Curva padrão de log MM em função do Rf do padrão de massa molecular construída após corrida eletroforética.

ANEXO III

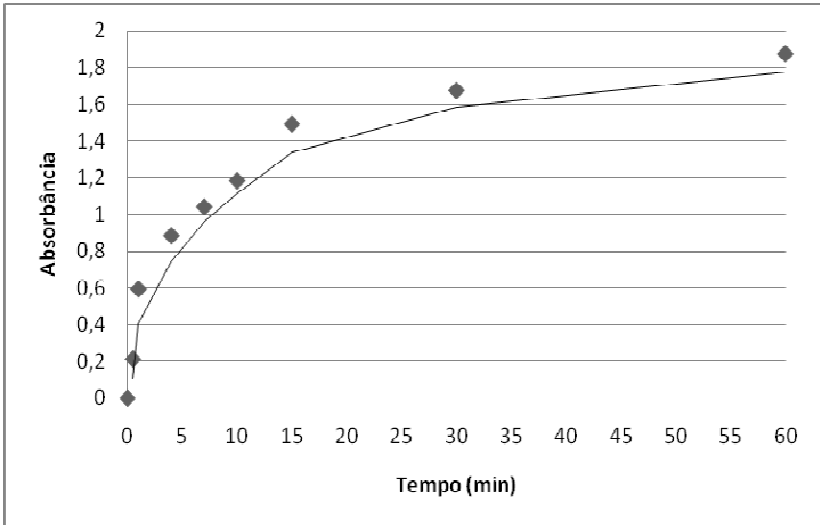


Figura A.2 – Cinética de formação de AR apresentada como absorbância em função do tempo, utilizando uma solução de 1mL/L da enzima pectinase incubada a 30°C na presença de 0,25% (p/v) de pectina cítrica em 50 mM de tampão tris-HCl 30°C, pH 9,5. ($\lambda_{\text{máx}} = 530\text{nm}$)

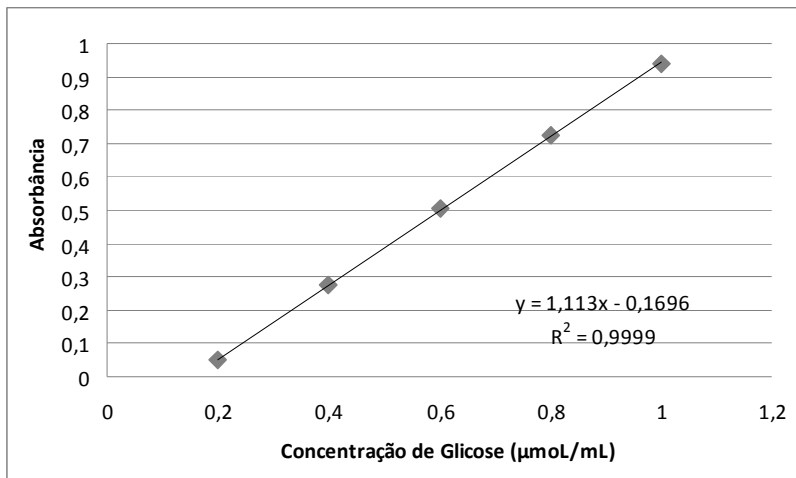


Figura A.3 – Curva de calibração de glicose. Construída com soluções padrões de glicose com concentrações variando de 0,2 a 1,0 µmol/mL em solução tampão tris-HCl pH 9,5. A absorbância foi medida com $\lambda_{\text{máx}} = 530\text{nm}$.