

# Estabilização de Enzimas para Modificação de Fibras Sintéticas

**Ana Filipa Gonçalves da Costa Carneiro**

Dissertação de Mestrado em Tecnologias de Fabricação



Escola de Engenharia

Departamento de Engenharia Têxtil

Portugal

Junho 2003

Ao Mané  
e aos meus Pais

## **AGRADECIMENTOS**

Quero expressar, em primeiro lugar, o meu sincero agradecimento ao Professor Doutor Artur Cavaco Paulo, pela forma empenhada e construtiva como encarou o presente trabalho.

Ao Departamento de Engenharia Têxtil da Universidade do Minho por ter disponibilizado meios físicos e técnicos indispensáveis para a elaboração deste trabalho.

Ao Eng. Domingos, da empresa Fisipe, pelo fornecimento das amostras de acrílica usadas neste trabalho.

À Carla pelo apoio e sugestões prestadas ao longo da execução do presente trabalho.

Ao Tzanko pelas sugestões efectuadas durante o trabalho.

A todos os meus amigos e colegas de trabalho pelo fantástico ambiente proporcionado.

Guimarães, 12 de Junho de 2003

## RESUMO

A qualidade e as propriedades de processamento das fibras têxteis podem ser melhoradas modificando a superfície do polímero. Grande parte dos métodos convencionais descritos na literatura, requer agentes químicos com efeitos negativos para o ambiente. Estes podem ser evitados aplicando novas técnicas de processamento do polímero baseadas em biotecnologia.

Neste trabalho estudou-se a estabilidade de enzimas hidrolíticas capazes de melhorar a hidrofiliidade de tecidos sintéticos. As enzimas estudadas foram a lipase, protease e nitrilase, que hidrolisam respectivamente as fibras de poliéster, poliamida e acrílica. O efeito da adição de estabilizadores foi estudado nesta tese, com o objectivo de aumentar o tempo em que as enzimas permanecem activas. Pretendeu-se ainda analisar o efeito da adição de alguns solventes orgânicos, que dissolvem a fibra. Quando adicionados em pequenas quantidades, facilitam a acessibilidade dos seus grupos menos expostos.

A estabilização das três enzimas foi melhorada com a adição de alguns estabilizadores a elevadas concentrações (1 M), nomeadamente o sorbitol para a lipase e nitrilase e o glicerol para a protease. A adição dos solventes orgânicos utilizados nas fibras sintéticas teve um efeito negativo nas respectivas enzimas. O efeito foi menos acentuado ( $\leq 10\%$ ) com a adição de dimetilacetamida na solução enzimática de lipase e nitrilase, e de dimetilformamida na protease.

Para finalizar, foi investigada a acção hidrolítica das enzimas nas fibras sintéticas. Verificou-se que o tingimento da fibra acrílica tratada com nitrilase pode ser feito a temperatura inferior à de transição vítrea, obtendo a mesma qualidade de tingimento. Este efeito foi reforçado com o uso de sorbitol e dimetilacetamida.

## ABSTRACT

The quality and properties of synthetic fibers can be improved by modifying surface of the fibers. Traditional processes used to modify polymer surfaces use strong chemical agents, which have detrimental effects on the environment. The enzymatic treatment of textiles can replace the need for strong chemical agents.

In the present work, the stability of hydrolytic enzymes used to modify synthetic fibers was investigated. Lipase, protease and nitrilase were the studied enzymes which hydrolyze respectively, polyester, polyamide and acrylic fibers. The stability of these enzymes was studied by the addition of stabilizing agents, which improves the time that enzymes are active. The stability of lipase, protease and nitrilase was also investigated by the addition of organic solvents, to facilitate the accessibility of the fibres groups to the enzyme.

The stability of the enzymes was increased by addition of specific stabilizers at high concentrations (1 M), for example sorbitol for lipase and nitrilase and glycerol for protease. The addition of organic solvents caused a decrease in enzyme stability for all enzymes investigated. However, a small decrease ( $\leq 10\%$ ) in enzyme stability was observed by adding dimethylacetamide to lipase and nitrilase and dimethylformamide to protease.

The action of hydrolytic enzymes on synthetic fibers was also investigated. The treatment of acrylic fibers with nitrilase caused an increase in dye uptake of the fibers. Nitrilase treatment allowed acrylic fibers to be dyed at less than the glass transition temperature. This effect was higher with addition of sorbitol and dimethylacetamide.

# ÍNDICE

	Página
I APRESENTAÇÃO DO TRABALHO	1
II INTRODUÇÃO	2
1 Enzimas	2
1.1 Enzimas na Indústria Têxtil	3
1.2 Estrutura tridimensional	4
1.3 Produção de enzimas	6
1.4 Classificação de enzimas	6
1.5 Enzimas hidrolíticas	8
1.5.1 Lipases	9
1.5.2 Proteases	10
1.5.3 Nitrilases	11
2 Cinética Enzimática	12
2.1 Mecanismo de Catálise Enzimática	12
2.2 Actividade catalítica	13
2.3 Perfil de pH	13
2.4 Perfil de temperatura	14
2.5 Estabilidade enzimática	14
2.5.1 Mecanismos de desactivação enzimática	15
2.5.2 Efeito de estabilizadores	17
2.5.3 Efeito de solventes orgânicos	18
3 Fibras	18
3.1 Poliéster	18
3.2 Poliamida	21
3.3 Acrílica	26
III MATERIAIS E MÉTODOS	30
1 Materiais	30

1.1 Enzimas	30
1.2 Estabilizadores	31
1.3 Solventes da fibras sintéticas	32
1.4 Tecido de fibra acrílica	32
1.5 Corante	33
1.6 Equipamentos	33
2 Métodos	33
2.1 Determinação de concentração de proteína	33
2.2 Determinação das actividades enzimáticas	35
2.2.1 Actividade da lipase	35
2.2.2 Actividade da protease	37
2.2.3 Actividade da nitrilase	38
2.3 Propriedades catalíticas das enzimas	39
2.3.1 Perfil de pH	39
2.3.2 Perfil de temperatura	40
2.3.3 Estabilidade enzimática	40
2.4 Tratamento enzimático da fibra acrílica	42
2.5 Determinação da perda de peso	42
2.6 Tingimento	43
2.7 Determinação do valor de reflectância	43
2.8 Tratamento estatístico dos dados	44
IV RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO	47
1 Método para determinação da actividade da lipase	47
2 Caracterização das enzimas	51
2.1 Determinação da concentração em proteína	51
2.2 Perfis de pH e temperatura	51
2.2.1 Lipase	51
2.2.2 Protease	53
2.2.3 Nitrilase	54
2.2.4 Resumo	56

3 Estabilidade enzimática	57
3.1 Lipase	58
3.2 Protease	61
3.3 Nitrilase	64
3.4 Resumo	66
4 Tratamento Enzimático da Fibra Acrílica	68
4.1 Perda de peso	68
4.2 Tingimento	69
4.3 Resumo	70
V CONCLUSÕES	71
VI PERSPECTIVAS FUTURAS	73
VII BIBLIOGRAFIA	75

## I - APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

As enzimas hidrolíticas lipase, protease e nitrilase são responsáveis pela hidrólise de grupos éster, amida e nitrilo, ligações estas que existem nas fibras de poliéster, poliamida e acrílica, respectivamente. A hidrólise destas ligações provoca a formação de grupos carboxílicos que conferem hidrofiliidade às fibras, melhorando as suas propriedades tintoriais. Neste trabalho pretendia-se melhorar a acção das enzimas nas fibras têxteis, pelo que se estudou o efeito da adição de diversos estabilizadores conhecidos na literatura por aumentar o tempo em que a enzima se mantém activa.

No entanto, as fibras sintéticas apresentam a sua estrutura bastante fechada, devido às forças ou interacções entre cadeias vizinhas, e por isso nem sempre são acessíveis à enzima. Para abrir a sua estrutura podem ser usados agentes aceleradores (carriers), conhecidos por facilitar a absorção dos corantes nas fibras. O uso destas substâncias poderá também facilitar a absorção da enzima na fibra. No entanto, estes solventes podem ter um efeito negativo nas enzimas a que vão ser adicionados, pelo que é necessário estudar o seu efeito.

Para finalizar, verificou-se o efeito dos estabilizadores e dos solventes nas enzimas, através da realização de vários ensaios demonstrativos da acção da enzima nitrilase na fibra acrílica.

## II - INTRODUÇÃO

Os processos enzimáticos podem ser utilizados para alterar as propriedades das fibras têxteis e têm como principal vantagem, sobre a utilização de reagentes químicos, o facto de não implicarem qualquer efeito nefasto para o ambiente. Facto este, pelo qual nos últimos anos, com a crescente consciencialização e preocupação pelo meio ambiente, se tem vindo a desenvolver a aplicação das enzimas.

### 1 - Enzimas

As enzimas são as unidades funcionais do metabolismo celular, que conferem à célula a capacidade de activar e controlar uma grande variedade de reacções indispensáveis ao seu funcionamento.

Em 1883 surgiu provavelmente o primeiro reconhecimento experimental da existência de catalisadores biológicos, quando Payen e Persoz observaram que o precipitado pelo álcool num extracto de malte continha uma substância capaz de converter o amido em açúcar (26). Nas últimas décadas, a aplicação tecnológica das enzimas tem vindo a aumentar. Têm sido propostas muitas aplicações para as enzimas, e muitas delas têm vindo a ser comercializadas. Hoje em dia, destacam-se as proteases essencialmente utilizadas no fabrico de detergentes, as amilases na hidrólise do amido em açúcar mais simples, as

reninas no fabrico de queijos, as isomerases na produção de açúcar invertido e as lipases para hidrolisar ácidos e ésteres gordos, mas também na produção de farmacêuticos, químicos, em análises clínicas e na medicina.

### **1.1- Enzimas na Indústria Têxtil**

A aplicação de enzimas na indústria têxtil (I.T.) é conhecida há muitos anos. É uma tecnologia com baixo impacto ambiental e por isso, objecto de estudo aprofundado. As primeiras aplicações enzimáticas na I.T. consistiam na modificação química da superfície da fibra do algodão, de modo a melhorar as suas propriedades, por remoção de componentes indesejáveis adsorvidos como gorduras, ceras, proteínas, etc. Outro exemplo é o bio-polimento dos tecidos de algodão para obter o efeito “stone-washing”. As enzimas celulases são usadas no acabamento dos tecidos de algodão, melhorando as propriedades de toque, o bom desempenho e o efeito de conforto (7).

O processo de descolagem é um passo preliminar e essencial no processamento de tecidos de algodão. O amido é uma mistura de dois carboidratos, amilose e amilopectina, existente nos tecidos de algodão encolado e que deve ser retirado. A amilopectina é insolúvel em água, devendo ser em primeiro lugar completamente solubilizada para a sua remoção. A enzima amilase hidrolisa as moléculas de amido em passos sucessivos formando dextrina (polissacarídeo), maltose (dissacarídeo) e finalmente glucose monossacarídea, a unidade mais simples da molécula de amido.

O bio-polimento foi introduzido inicialmente com o objectivo de fornecer ao tecido de algodão uma aparência mais limpa, suave e um toque mais agradável. No entanto, hoje em dia, é muito usado em todas as áreas de tecidos celulósicos. O bio-polimento é essencialmente um processo com acção degradativa, resultando um tecido com menor peso e resistência. Estas perdas devem ser apenas moderadas e por isso há necessidade de controlar as operações do processo. O efeito “stonewashing” é produzido por uma acção mais severa deste tratamento enzimático associado a stress mecânico como a

fricção. Esta acção produz nos tecidos “denim” uma aparência velha, através da remoção não homogénea do corante indigo. A enzima responsável por este efeito é a celulase.

Uma das principais aplicações de enzimas no processamento de lã é inibir na lã resistência ao encolhimento. Isto porque os tecidos de lã não tratados têm uma tendência natural para o encolhimento irreversível. Para evitar este efeito indesejado, os tecidos podem ser quimicamente modificados, ou tratados enzimaticamente, sendo esta última uma tecnologia ambientalmente mais limpa. As enzimas que actuam na lã são as proteases, que catalizam reacções de hidrólise. À semelhança das celulases, existem endoproteases que atacam as ligações peptídicas da cadeia e exoproteases que actuam apenas nas ligações terminais de cada cadeia. O ataque enzimático na lã tem como consequência uma perda de resistência e peso, pelo que devem ser controladas as condições de operação, tais como a temperatura, pH e concentração enzimática.

Hoje em dia, a aplicação de enzimas na I.T. não se fica pela modificação das propriedades superficiais das fibras. Tem sido investigada a sua aplicação na substituição de processos agressivos ao meio ambiente, para remoção de agentes contaminantes dos efluentes têxteis (9). Como exemplo pode-se referir o agente de branqueamento  $H_2O_2$ , que deve ser removido da água de lavagem dos tecidos de algodão branqueados. Acontece que, para tal, é necessário um elevado consumo de água e energia. As catalases podem aqui ser aplicadas para degradar  $H_2O_2$ . O efluente reciclado pode ser usado para tingimento de fibras têxteis, diminuindo o consumo de água, energia e tempo.

## 1.2 - Estrutura tridimensional

As enzimas são proteínas constituídas por aminoácidos ligados entre si por ligações amida, chamadas ligações peptídicas. Um grupo amina num aminoácido é unido ao ácido carboxílico de outro aminoácido, formando uma

longa cadeia peptídica. Esta é a estrutura primária de uma proteína, caracterizada pelo tipo e ordem dos aminoácidos da cadeia peptídica. Partes desta cadeia podem-se organizar em hélices  $\alpha$  ou folhas plissadas  $\beta$ , devido às ligações de hidrogénio entre os grupos electronegativos, como os átomos carbonilo e hidrogénio ligados ao oxigénio e nitrogénio, respectivamente (12). Embora sejam mais fracas que as ligações covalentes formadoras da estrutura primária, as ligações de hidrogénio garantem a força da estrutura secundária. A estrutura terciária cataliticamente activa é formada por ligações covalentes dissulfídicas (-S-S-), entre dois aminoácidos cisteína em diferentes zonas da cadeia, ligações hidrogénio e forças Van der Waals. A catálise ocorre numa área constituída pelo conjunto de aminoácidos directamente envolvidos no processo de catálise, chamada centro activo da enzima.

O “centro activo” da enzima ocupa apenas 10 a 20% do volume total da enzima. É aqui que toma lugar a química enzimática. Devido à sua estrutura tridimensional, as enzimas são específicas para as reacções que catalisam (5). Noutras palavras, são específicas para os substratos em que vão actuar.

O centro activo é normalmente uma cavidade hidrofílica, tendo sido propostos três tipos essenciais de configuração do centro activo, para as enzimas que actuam sobre cadeias: em fenda, em depressão pouco cavada e em poço (26). Nas hidrolases, o centro activo em forma de fenda surge nas enzimas que actuam sobre cadeias cuja ligação a quebrar está bastante exposta. Para hidrólise de ligações do interior de moléculas volumosas, a enzima deve apresentar um centro activo em ligeira depressão, pois a enzima tem de se encostar a essas grandes moléculas para as “atacar”. Para hidrólise de extremidades de cadeias, o centro activo deve ter a forma de poço, no qual essa cadeia se vai encaixar. A especificidade enzimática está assim intimamente relacionada com as características de configuração do centro activo da enzima e a sua relação com a molécula dos possíveis substratos, como o seu tamanho e forma.

### 1.3- Produção de enzimas

As enzimas podem ser obtidas a partir de vegetais, animais ou microrganismos. As enzimas que têm sido mais utilizadas a nível industrial são as obtidas por processos fermentativos, ou seja, a partir de culturas microbianas.

A sua utilização tem vindo a crescer devido aos avanços no campo da microbiologia e ainda pelo facto de a sua produção não estar condicionada por questões sazonais ou geográficas e pela possibilidade de se usarem matérias-primas pouco dispendiosas. Seleccionando as estirpes e optimizando os meios de cultura, é possível obter elevados rendimentos e enzimas com propriedades e especificidades bem determinadas. Apresenta, no entanto, algumas desvantagens relativas aos elevados custos de investimento e de consumo de energia e também aos riscos de contaminação associados a estes processos de produção. Desvantagens estas que são superadas, em larga escala, pelas vantagens acima referidas.

### 1.4 - Classificação das enzimas

A nomenclatura das enzimas aceite, hoje em dia, é a recomendada pela Comissão Internacional sobre enzimas, constituída pela União Internacional de Bioquímica. As enzimas estão divididas em seis grandes classes de acordo com o tipo de reacção química catalizada, pois é esta a propriedade específica que as distingue: (1) Oxido-redutases, (2) Transferases, (3) Hidrolases, (4) Liases, (5) Isomerases, (6) Ligases (26).

Para fazer a distinção entre enzimas da mesma classe, ou seja, catalizadoras da mesma reacção química, criou-se um esquema de numeração que compreende 4 dígitos. O primeiro diz respeito à classe, o segundo e terceiro dígitos ao tipo de reacção e o último refere-se ao tipo de substrato usado na reacção.

## 1 Oxidorredutases

Estas enzimas catalisam reacções de oxidação-redução:



Nesta classe, incluem-se as desidrogenases, redutases, oxidases, oxigenases, peroxidases e hidrogenases. O segundo dígito da classificação numérica indica o dador do átomo de H ou do electrão redutor e o terceiro dígito indica o respectivo aceitador.

## 2 Transferases

As transferases catalisam a transferência de diversos grupos químicos entre dois compostos:



Como exemplo de enzimas desta classe podem citar-se as aminotransferases, cinases, acetiltransferases e as fosforilases. O segundo dígito indica o tipo geral do grupo transferido e o terceiro dígito a natureza do grupo transferido.

## 3 Hidrolases

As hidrolases constituem uma classe muito extensa de enzimas que têm como função primária o desdobramento de compostos através da quebra de ligações por reacção com a água (hidrólise):



As reacções de hidrólise são fortemente deslocadas no sentido de formação dos produtos.

Incluem-se as lipases, proteases, nitrilases e esterases, entre outras, que hidrolisam respectivamente: lípidos, péptidos, nitrilos e ésteres e vários tipos de ligações de grupos fosfato a compostos orgânicos (26).

#### 4 Liases

Nesta classe, as enzimas catalizam reacções reversíveis, não hidrolíticas de remoção-fixação.

Incluem-se as descarboxilases e carboxilases, as aldolases e as desidratases e hidratases. O segundo dígito descreve o tipo de ligação que é quebrada e o terceiro indica o grupo removido.

#### 5 Isomerases

Estas enzimas catalisam diferentes tipos de isomerização.

Nesta classe, usam-se as designações triviais de racemases (transformação de formas D e L), epimerases (transformação de epímeros entre si) e as isomerases (transformação de formas cis e trans). O segundo dígito refere-se ao tipo de reacção envolvida, e o terceiro indica o tipo de molécula que sofre isomerização.

#### 6 Ligases

Estas enzimas, também designadas por sintetases, promovem a união de duas moléculas para formar um novo composto, recorrendo à energia libertada pela hidrólise de um nucleosídeo trifosfato como o ATP, segundo uma equação do tipo:



### 1.5- Enzimas hidrolíticas

As enzimas hidrolíticas são, como já foi referido, capazes de hidrolizar lípidos, péptidos, nitrilos e ésteres e vários tipos de ligações de grupos fosfato a compostos orgânicos (26). O segundo dígito da classificação refere-se ao tipo

de ligação hidrolisada: éster, glicosídica (ligando porções de carboidratos), peptídica, ligações CN em não péptidos e anidridos ácidos.

### 1.5.1- Lipases

As hidrolases éster carboxílicas (EC 3.1.1) são constituídas por várias enzimas, entre as quais, a carboxilesterase (EC 3.1.1.1) e a lipase triacilglicerol (EC 3.1.1.3). Ambas actuam nos ésteres carboxílicos, mas diferem no tipo de esterres que hidrolisam.

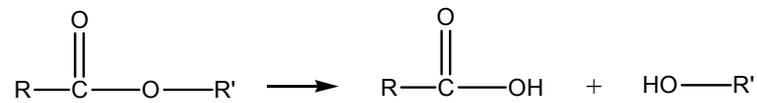


Figura 1. Reacção hidrolítica catalisada pela lipase.

As lipases (hidrolases triacilglicerol, EC 3.1.1.3) catalizam a hidrólise de triglicérides insolúveis, de longa cadeia e outros esterres insolúveis de ácidos gordos, com uma variada especificidade de comprimento da cadeia. Por este facto pensa-se que as lipases possam actuar na cadeia da fibra de poliéster hidrolizando as ligações éster mais superficiais desta fibra. São formados ácidos carboxílicos e álcoois, resultando uma fibra com menor número de ligações éster (**24**).

A reacção hidrolítica é geralmente realizada em solvente orgânico, uma vez que nem todos os substratos são solúveis em água (**2**).

A acção da enzima na fibra de poliéster pretende-se que seja efectiva, pelo que é aconselhável facilitar a sua absorção no interior da fibra que se apresenta na forma cristalina. Para isso, devem ser adicionadas pequenas quantidades de solventes que tornam a fibra mais acessível.

## 1.5.2 – Proteases

As proteases são um grupo de enzimas cuja função catalítica é hidrolisar ligações peptídicas de proteínas. São também chamadas de enzimas proteolíticas. As proteases diferem na sua capacidade de hidrolisar várias ligações peptídicas em que cada tipo de protease quebra uma ligação peptídica específica. Como exemplos de proteases temos as aminopeptidases, dipeptidases, carboxipeptidases, serina, cisteína e metalo proteases.

As proteases serina usadas neste trabalho são uma classe de enzimas que quebram ligações peptídicas e podem ser obtidas de bactérias, vírus e eucariotas. Incluem uma grande variedade de actividade peptidase como exopeptidase e endopeptidase.

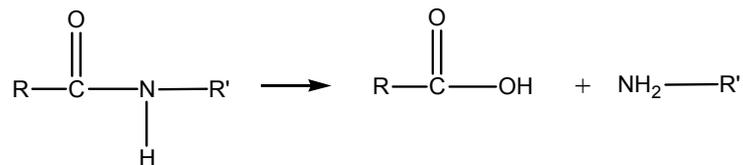
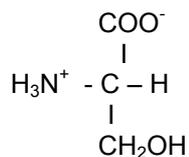


Figura 2. Reacção hidrolítica catalisada pelas proteases serina.

O seu mecanismo é baseado num ataque nucleofílico à ligação peptídica pela serina. A sua actividade depende dum resíduo de aminoácido no centro activo da enzima, que é sempre uma serina:



As proteases serina poderão assim actuar na cadeia da fibra de poliamida hidrolizando as ligações peptídicas desta fibra. Desta hidrólise resultam fibras com menor número de grupos amida e com aumento de grupos carboxílicos e aminas.

## 1.5.3 - Nitrilases

As enzimas membro da superfamília das nitrilases desempenham uma grande variedade de reacções de hidrólise da ligação carbono-nitrogénio. A superfamília das nitrilases foi classificada em 13 subcategorias, embora apenas seja conhecida uma com actividade nitrilase desempenhando hidrólise de grupos nitrilos (**23**).

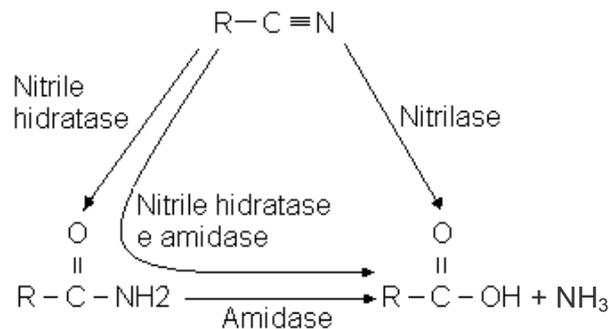


Figura 3. Reacções catalisadas por algumas enzimas da superfamília nitrilase.

Os nitrilos podem ser convertidos em ácidos carboxílicos e amónia por acção de apenas uma enzima, a nitrilase (EC 3.5.5.1), sem a formação de uma amida intermédia. Esta enzima pode ser encontrada em plantas, animais, fungos e muitos tipos de bactérias (**23**) como *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Klebsiella*, *Nocardia* e *Bacillus pallidus* (**29**). Muitas destas enzimas actuam preferencialmente em substratos aromáticos ou heterocíclicos, como o benzonitrilo (**29**).

Uma das possibilidades de monitorizar a actividade da nitrilase é usar substratos em que o grupo R é o anel benzóico ( $C_6H_6$ ), ou seja, o benzonitrilo ( $C_6H_5CN$ ) é hidrolisado, formando ácido benzóico ( $C_6H_5COOH$ ) e amónia ( $NH_3$ ).

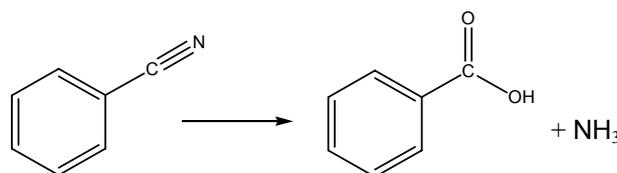


Figura 4. Hidrólise do substrato benzonitrilo catalisada pela nitrilase.

Pretende-se que a enzima nitrilase quebre o grupo nitrilo da fibra acrílica formando grupos carboxílicos terminais. Deste modo, a fibra fica mais hidrofílica e por isso o tingimento é facilitado.

## 2 - Cinética enzimática

A cinética enzimática estuda a velocidade das reacções catalisadas por enzimas. Os estudos cinéticos dão-nos informação sobre os mecanismos envolvidos na reacção catalítica, através da análise do efeito de factores como a temperatura, pH e concentração de substrato e inibidores.

### 2.1 - Mecanismo da catálise enzimática

As enzimas apresentam um elevado grau de estéreo-especificidade, como já foi referido anteriormente. A especificidade de uma enzima para o substrato foi demonstrado por Emil Fischer, em 1884, propondo uma relação análoga à da “chave - fechadura” para a enzima e o seu substrato.

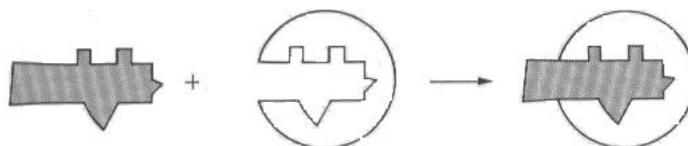


Figura 5. Modelo “chave - fechadura” para a enzima e substrato (26).

O substrato aloja-se na porção de enzima que apresenta uma configuração complementar à sua, enquanto os grupos químicos estabelecem as ligações com os radicais do centro activo. No entanto, a formação do complexo enzima-substrato só foi verificado experimentalmente oito anos mais tarde por Brown.

## 2.2 - Actividade catalítica

A actividade catalítica de uma enzima representa a sua capacidade de catalisar uma reacção e é definida como a quantidade de produto formado ou substrato consumido por unidade de tempo.

A quantidade de produto formado (ou substrato consumido) não é directamente proporcional ao tempo. A velocidade de formação de produto (ou consumo de substrato) e a actividade enzimática decrescem com o tempo. Esta diminuição de velocidade pode ser devida a vários factores, como por exemplo, a desactivação da enzima pela temperatura ou pH a que a reacção decorre, a inibição da enzima pelos produtos de reacção e a diminuição do grau de saturação da enzima com o substrato. No entanto, no início da reacção, estes efeitos ainda não são significativos, pelo que a actividade catalítica é conhecida com mais precisão neste instante (26).

Assim, em estudos de cinética deve ser utilizada a actividade enzimática num curto intervalo de tempo após  $t=0$ , ou o valor limite da actividade quando o tempo tende para zero.

## 2.3 - Perfil de pH

Todas as enzimas são afectadas pelo pH do meio. São essencialmente activas numa pequena gama de pH, com um pH óptimo correspondente à actividade máxima. O pH óptimo é, de uma forma geral, bem definido e situa-se próximo da neutralidade (entre pH 5 e 9). No entanto, a actividade máxima pode verificar-se não só para um valor, mas para uma gama de várias unidades de pH (26). O pH óptimo varia, frequentemente, com o tipo de substrato.

O efeito do pH na catálise enzimática é devido à variação da concentração em  $H^+$  e consequentemente aos diferentes estados de ionização da enzima, do substrato e do complexo enzima-substrato. Uma enzima pode existir em diferentes estados de ionização, uma vez que sendo uma proteína tem vários

grupos ionizáveis. O impacto na actividade tem a ver com a proximidade entre os grupos ionizados e o centro activo da enzima.

Assim, o efeito do pH na velocidade das reacções enzimáticas pode ser devido às alterações da estabilidade da enzima, da afinidade da enzima para o substrato e da transformação catalítica em si. Estes três factores podem actuar de um modo isolado ou combinado.

#### **2.4 - Perfil de temperatura**

O efeito da temperatura sobre a actividade catalítica pode ser devido a vários factores, tais como a alteração da estabilidade da enzima, da velocidade de transformação do complexo enzima-substrato e da afinidade entre substrato e enzima (26).

Para temperaturas de operação superiores à óptima, a desactivação enzimática é mais acentuada, apresentando menor actividade média. Como a desactivação da enzima é menos acentuada para temperaturas inferiores à óptima, convém trabalhar a estas temperaturas, que se traduzem num aumento de actividade média.

#### **2.5 - Estabilidade enzimática**

A estabilidade enzimática indica a variação da actividade da enzima ao longo do tempo, pelo que uma fraca estabilidade da preparação enzimática traduz uma rápida perda da sua actividade. Em condições moderadas as enzimas são bons catalisadores em termos de actividade catalítica, selectividade e capacidade de funcionamento. No entanto, é de realçar que a aplicação limitada de enzimas na indústria é devida à fraca estabilidade operacional em certas condições presentes nos processos industriais.

A desactivação das enzimas pode ser devida a vários factores, tais como elevadas temperaturas, pH alcalino ou ácido, ou por acção de agentes desnaturantes, entre outros. As enzimas são de um modo geral estáveis à temperatura ambiente dos organismos de que são obtidas, e perdem a sua actividade quando a temperatura aumenta significativamente. Na indústria têxtil, a desactivação térmica e por pH alcalino ou ácido são talvez os modos mais importantes de desactivação enzimática, devendo-se ao facto da indústria têxtil operar a temperaturas muito elevadas e valores de pH não neutros. Acresce ainda o facto de muitos substratos serem insolúveis e apenas dissolvidos a elevadas temperaturas ou em solventes orgânicos.

As enzimas com interesse para aplicações tecnológicas, devem ser estáveis nas condições operacionais por um longo período de tempo. No entanto, a maior parte das enzimas não satisfazem este requisito. Para ultrapassar este problema podem ser procuradas novas fontes de enzimas, obtidas de microrganismos que vivem em condições extremas de pH e temperatura (extremófilos), ou adicionar estabilizadores de enzimas, que a mantenham activa durante o tempo necessário.

#### *Estabilidade ao Armazenamento*

Algumas enzimas são pouco estáveis à temperatura ambiente, limitando a sua aplicação e dificultando a sua distribuição e uso. As enzimas podem ser, de um modo geral, armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou  $+4^{\circ}\text{C}$  na presença de um estabilizador, de modo a prolongar a sua estabilidade.

#### 2.5.1 - Mecanismos de desactivação enzimática

O primeiro passo fundamental na desactivação é o desdobramento da estrutura da molécula. Em condições normais, a enzima apresenta uma estrutura nativa e cataliticamente activa que é mantida por um balanço de forças não-covalentes: ligações de hidrogénio, iónicas, interacções hidrofóbicas, Van der Waals, etc. A temperaturas elevadas ou outras condições extremas, todas

estas forças, com excepção das interacções hidrofóbicas, que apenas são significativas acima de 60°C, diminuem e a macromolécula da proteína desestabiliza, isto é, adquire uma conformação mais desordenada. Na estrutura tri-dimensional nativa da enzima, o centro activo consiste em diversos aminoácidos próximos entre si. Assim, o desdobramento da estrutura resulta na desintegração do centro activo, provocando a inactivação da enzima.

De um modo geral, a actividade enzimática diminui exponencialmente ao longo do tempo, obedecendo a um modelo de 1ª ordem de desactivação das enzimas, cuja equação pode ser representada por:

$$-\frac{dA}{dt} = k_d \times A$$
$$\Rightarrow A = A_0 \cdot \exp(-k_d \times t)$$

sendo,

$A_0$  – actividade enzimática inicial;

$A$  – actividade enzimática no tempo  $t$ ;

$k_d$  – constante de desactivação ( $\text{min}^{-1}$ );

$t$  – tempo de reacção (min).

A estabilidade térmica é estudada através do tempo de meia-vida,  $t_{1/2}$ , definido como o tempo que a enzima demora a perder 50 % da sua actividade inicial:

$$A / A_0 = \exp(-k_d \times t)$$

$$\ln(A / A_0) = -k_d \times t_{1/2}$$

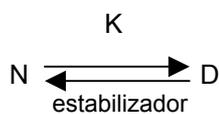
$$t_{1/2} = -\frac{\ln(A / A_0)}{k_d} = \frac{\ln 2}{k_d}$$

### 2.5.2 - Efeito de estabilizadores

É prática laboratorial comum, já há mais de meio século, para bioquímicos e biólogos, ao isolarem uma enzima, armazenarem esse material em glicerol concentrado (~ 1 M), sucrose, ou uma substância similar, de modo a preservar a sua actividade. Alguns polióis como o sorbitol, xilitol ou glicerol são conhecidos por estabilizar a actividade biológica, quando adicionados a altas concentrações (~1 M). No entanto, o mecanismo de estabilização da estrutura proteica não era conhecido. Hoje em dia, têm sido feitos esforços de modo a entender a base física da estabilização da estrutura nativa da proteína em soluções aquosas pela adição de solventes a altas concentrações.

Os polióis conferem hidratação da proteína, constituindo uma camada de água que rodeia a proteína. As moléculas de poliál são preferencialmente excluídas da camada superficial da molécula proteica e a água rodeia a molécula proteica preservando a sua estrutura, ou seja, a conformação da proteína fica mais rígida.

A desnaturação da enzima numa solução aquosa procede via a exposição da parte hidrofóbica da proteína em água. A reacção de desestabilização, ou seja, de desnaturação da proteína, pode ser expressa como um simples equilíbrio de dois estados entre o estado nativo (N) e o desnaturado (D). Na presença de um estabilizador, este equilíbrio é deslocado para a forma mais estável, a nativa, podendo a reacção ser expressa por (11):



com: 
$$K = \frac{[D]}{[N]}$$

Por definição, a constante de equilíbrio desta reacção é dependente da concentração do estabilizador.

### 2.5.3 - Efeito de solventes orgânicos

Uma fibra apresenta-se na forma cristalina através de fortes forças intramoleculares, que ao agruparem as cadeias de um modo ordenado formam cristais muito resistentes. O contacto entre o polímero e a água é mínimo, mas pode ser aumentado adicionando solventes orgânicos que dissolvem as fibras ou abrem a morfologia da fibra (1). Deste modo, é facilitada a difusão da enzima no interior da fibra, para que a sua acção seja mais efectiva.

As enzimas são cataliticamente activas em solventes orgânicos devido a manterem a sua conformação nativa. A incapacidade da proteína desactivar-se em meio não-aquoso deve-se, em parte, ao aumento das interacções electrostáticas em solventes orgânicos, devido à baixa dieléctrica de grande maioria dos solventes, e também, devido ao aumento das ligações de hidrogénio intramoleculares.

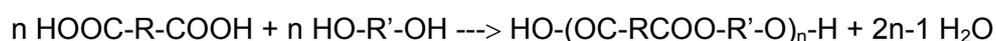
É intuitivo que a estabilidade da proteína em ambientes não aquosos deve ser muito diferente da estabilidade em água. As moléculas de água que rodeiam a enzima numa solução aquosa contribuem para todas as forças, que estabilizam a conformação activa, incluindo as interacções Van der Waals, ligações de hidrogénio e pontes salinas.

## 3. Fibras

### 3.1 - Poliéster

#### *Preparação do polímero*

A reacção de condensação entre dois grupos funcionais diferentes, um diácido e um diálcool, dá origem a outro grupo funcional éster, formando-se poliéster (5). Esta reacção pode ser representada por:



A constituição química do poliéster fabricado à base de etilenoglicol (R' é CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) e ácido teraftálico (R é ) é a seguinte:

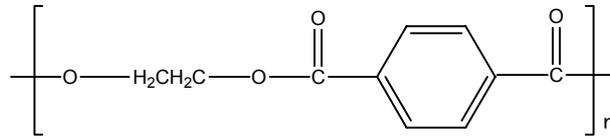


Figura 6. Estrutura química do poliéster.

### *Estrutura supramolecular*

A cristalinidade do poliéster obtém-se durante o processo de estiragem. Os grupos polares ésteres do polietileno teraftalato garantem ao poliéster um elevado grau de cristalinidade. Os anéis aromáticos tendem a agrupar-se de um modo orientado e ordenado, formando-se cristais muito resistentes **(32)**.

Ao aquecer o polímero observa-se uma transição vítrea a 67°C e acima de 100°C produz-se cristalização. Como acontece com todos os polímeros, a cristalinidade nunca é completa e a densidade do polímero cristalino varia com o grau de perfeição dos cristais. As cadeias moleculares encontram-se ligeiramente inclinadas relativamente ao eixo da fibra. Os segmentos alifáticos - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- adoptam a configuração trans e o agrupamento das cadeias fica bastante apertado, com o espaço livre reduzido. As distâncias entre átomos de moléculas vizinhas são características de interações Van der Waals, pelo que não há evidência estrutural da existência de forças de atracção fortes entre moléculas. Assim, o ponto de fusão da fibra de poliéster, 260°C, não deve ser atribuído a fortes forças de atracção entre moléculas, mas sim à rigidez do anel aromático e às ligações éster **(18)**.

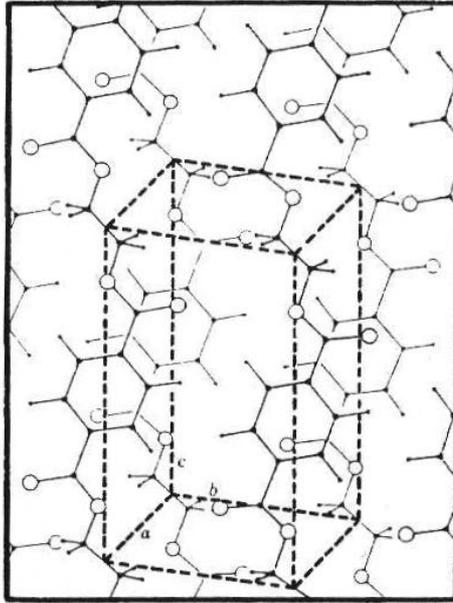


Figura 7. Estrutura molecular do poliéster (18).

### Propriedades tintoriais

O tingimento da fibra de poliéster apresenta grandes dificuldades atribuídas à baixa hidrofiliidade, ao carácter ácido muito fraco dos grupos carboxílicos terminais, e à alta compacticidade que apresentam as regiões amorfas ou desordenadas em que devem penetrar os corantes. Deste modo devem ser usados corantes insolúveis em água, como os dispersos e os azo (8). Para que outros corantes possam ser usados, devem ser modificadas as propriedades da fibra tornando-a mais hidrofílica.

#### *Corantes dispersos*

Os corantes dispersos tingem o poliéster por dissolução das partículas de corante no substrato fibroso. Quando o corante é aplicado através dum meio aquoso é a pequena quantidade de corante em solução que é absorvida pela fibra. Esta absorção é seguida pela dissolução de mais corante e assim sucessivamente. Entre a fibra e o banho estabelece-se um equilíbrio a que se aplica a lei de Henry, até alcançar-se a concentração de saturação.

Os corantes dispersos podem também ser transferidos para a fibra no estado gasoso. Sublimam quando aquecidos e o vapor do corante é absorvido pelas fibras hidrófobas.

A aplicação de corantes dispersos a fibras de poliéster apresenta alguns problemas, devido à baixa velocidade de difusão destes corantes na fibra. Deste modo, para conseguir tingimentos de cor média ou intensa, foi necessário desenvolver processos de tingimento especiais. A velocidade pode ser aumentada com a adição de agentes aceleradores ou carriers, ou tingindo a pressões baixas e temperatura de 130°C (8). Estes tingimentos apresentam menos desigualdades e efluentes menos contaminados.

### 3.2 - Poliamida

#### *Preparação do polímero*

As poliamidas são polímeros que contêm grupos amida como parte integral da cadeia polimérica. As poliamidas sintéticas são produzidas por condensação de moléculas pequenas, diamina e ácido dibásico, cuja ligação ocorre com formação de grupos amida:



A poliamida 6.6 é produzida pela interação de hexametileno diamina com ácido adípico (em que R é  $-(\text{CH}_2)_4-$  e R'  $-(\text{CH}_2)_6-$ ) formando a poliamida 6.6:

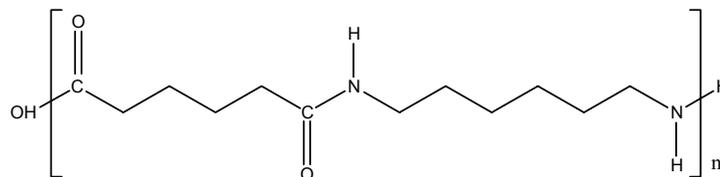


Figura 8. Estrutura química da poliamida 6.6.

A poliamida 6 é produzida pela polimerização de caprolactama. A sua estrutura química é muito idêntica à da poliamida 6.6. Apenas difere no comprimento da cadeia entre os grupos amido:

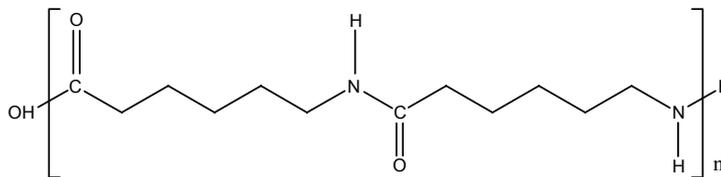


Figura 9. Estrutura química da poliamida 6.

### *Composição química*

Estas fibras possuem grupos  $-COOH$  e  $-NH_2$  nos extremos das macromoléculas. O reduzido número destes grupos não conferem um carácter hidrofílico à fibra, pelo que o seu tingimento é difícil. A estrutura molecular influencia indirectamente em todas as propriedades da fibra, mas principalmente e directamente nas propriedades químicas, tintoriais e absorção de humidade.

A poliamida tem essencialmente ligações de hidrogénio, mas tem também interacções de Van der Waals. Estas forças de baixa intensidade são de atracção electrostática entre cargas opostas de dipolos.

### *Estrutura supramolecular*

A estrutura química, a cristalinidade, a orientação molecular e os tratamentos prévios ao tingimento são muito importantes na afinidade e grau de tingimento da poliamida. A poliamida 6.6 e a 6 diferem no acoplamento dos grupos carbonilo e amido entre as cadeias hidrocarbonadas do polímero. Os grupos polares da amida da cadeia principal da poliamida 6.6, encontram-se fortemente unidos entre si através de ligações fortes por pontes de hidrogénios que mantêm os cristais unidos. Isto permite que as cadeias se alinhem de um modo ordenado para formar as fibras (31). Na poliamida 6 estes grupos funcionais sucedem-se com uma ordenação uniforme, que permite uma maior

abertura entre as moléculas. Esta estrutura mais aberta implica uma velocidade de difusão dos corantes mais rápida, sendo também maior a oportunidade do corante se fixar sobre a fibra. Assim, a poliamida 6 é mais facilmente tingida e mais sensível à penetração de produtos capazes de interagir com as poliamidas. A poliamida 6.6 apresenta duas formas cristalográficas que são conhecidas como formas  $\alpha$  e  $\beta$ . Nas amostras tratadas termicamente somente se encontra a forma  $\alpha$ , a qual, é mais estável e a que normalmente predomina.

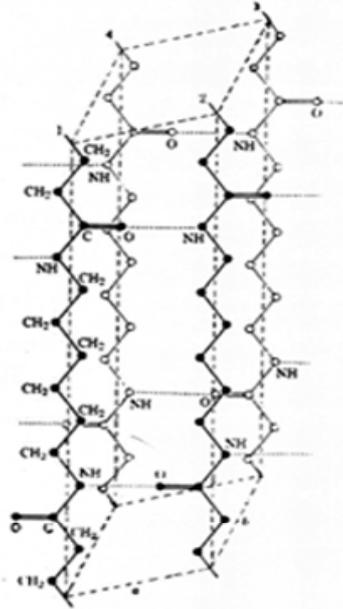


Figura 10. Cristal  $\alpha$ , poliamida (17).

As cadeias moleculares interagem através de pontes de hidrogénio formando estruturas secundárias (lâminas) cujo agrupamento forma a estrutura  $\alpha$ . A existência de pontes de hidrogénio é comprovada porque os átomos de oxigénio dos grupos CO de uma molécula situam-se sempre à frente dos grupos NH de uma molécula vizinha. A distância entre os átomos de oxigénio e nitrogénio é de 2,8 Å, menor que a distância normal das interações de Van der Waals e de acordo com a distância das pontes de hidrogénio entre grupos CO e NH, noutros cristais. Quanto à forma  $\beta$  sabe-se que as estruturas secundárias de pontes de hidrogénio são iguais às dos cristais  $\alpha$ , embora difiram na posição relativa. Nos cristais  $\alpha$ , cada estrutura secundária de moléculas movimenta-se sempre no mesmo sentido em relação à anterior, enquanto que nos cristais  $\beta$  as estruturas movimentam-se alternadamente para cima e para baixo.

## Propriedades tintoriais

A fibra de poliamida possui um reduzido número de grupos hidrofílicos, pelo que absorve pouca água. Deste modo, o tingimento nestas fibras é mais difícil.

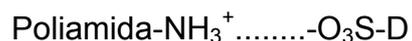
A poliamida 6 tem maior afinidade que a 6.6 para certos corantes, garantindo uma versatilidade no tingimento. São produzidos tingimentos mais brilhantes e profundos. No entanto, a solidez aos tintos é geralmente melhor na poliamida 6.6, pois o corante liga-se melhor à fibra

No tingimento da poliamida com corantes ácidos (ou aniónicos) o pH do banho de tingimento desempenha um papel fundamental. À medida que o pH diminui abaixo de 9,0 aumenta a capacidade dos átomos de hidrogénio da fibra de poliamida fixarem os iões hidrogénio ( $H^+$ ). A pH inferior a 6,5 a fibra torna-se fortemente catiónica e absorve o anião corante mais rapidamente.

Muitos corantes não permitem obter tingimentos em cores intensas a não ser que se tinja a baixo pH ( $\approx 2$ ), já que os grupos amino disponíveis não permitem fixar mais corante. No caso dos corantes ácidos de boa igualização, a absorção sobre a poliamida a pH 3 -7 limita-se aos grupos amino terminais com carga (grupos amónio). Depois de uma absorção superficial, o corante difunde-se lentamente no interior da fibra, formando ligações iónicas com os grupos amino terminais

### *Corantes ácidos*

Os corantes ácidos contêm grupos sulfónicos  $-SO_3H$  que lhes conferem solubilidade e afinidade para a poliamida (**14**). Os grupos sulfónicos carregados negativamente vão formar ligações iónicas com grupos amina que em meio ácido adquirem carga positiva:



Os corantes de dimensões moleculares mais pequenas, como os monoazo e os de antraquinona migram mais facilmente de umas zonas para outras, permitindo um tingimento mais uniforme.

Os corantes de monoazo são classificados como de boa igualização. Como exemplo típico deste tipo de corantes pode-se referir o Acid Red 74 com o grupo solubilizante  $-\text{SO}_3\text{H}$  o que é característica comum dos corantes aniónicos.

### *Corantes dispersos*

Os corantes dispersos também podem ser usados para o tingimento das poliamidas, embora sejam essencialmente usados para a fibra de poliéster. Por outro lado, os grupos hidroxilo podem facilitar o tingimento, utilizando corantes que têm afinidade para com estes grupos, formando-se ligações de hidrogénio, ou covalentes como no caso de corantes reactivos.

O tingimento de fibras de poliamida com corantes dispersos têm um maior poder de igualização, embora apresentem menor solidez (17). Recorre-se a este tipo de corantes quando se pretende tingimentos de boa igualização em fibras de diferente afinidade.

A diferente absorção de corante pode ter origem em diferenças de conteúdo de grupos terminais amino ou em diferenças de cristalinidade. A diferença de grupos terminais amino conduz a tingimentos defeituosos, sendo que as zonas tingidas com maior intensidade são as que apresentam maior quantidade destes grupos quando tingidas com corantes aniónicos. O tingimento com corantes dispersos não é tão sensível a este tipo de variações. O tingimento defeituoso devido a diferenças de cristalinidade já é comum a todo o tipo de corantes, seja porque são absorvidos em diferentes quantidades (dispersos) ou, no caso dos aniónicos, porque apresentam diferenças na facilidade com que acedem aos grupos amina.

### 3.3 - Acrílica

#### *Preparação do polímero*

O acrilonitrilo pode ser preparado em duas etapas a partir de óxido de etileno e ácido cianídrico. Na primeira etapa obtém-se solução aquosa de cianidrina etilénica a 55-60°C. O produto obtido evapora-se até ser atingida uma pureza cianidrina de 88-90 %. A cloridrina etilénica decompõem-se espontaneamente em acrilonitrilo e água. Obtendo-se, finalmente, acrilonitrilo de alta pureza por destilação:

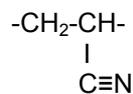


Figura 11. Acrilonitrilo.

O acrilonitrilo também pode ser obtido por reacção do ácido cianídrico com outros reagentes, tais como acetileno ou acetaldeído.

O copolímero de uma fibra acrílica constituída por acrilonitrilo e acetato de vinilo pode representar-se como:

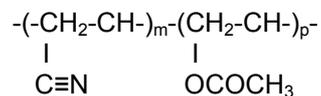


Figura 12. Copolímero de fibra acrílica.

Em que m e p correspondem à sequência média das unidades estruturais na cadeia polimérica. As fibras acrílicas podem ser 93 a 96% de poli(acrilonitrilo) e 4 a 7% de acetato de vinilo que será neste caso o comonómero.

#### *Composição química*

Certos compostos contendo ligações duplas sofrem alterações conhecidas como polimerização, em que a partir da ligação dupla, as moléculas pequenas se unem de modo a formar longas cadeias poliméricas (**8**).

As cadeias poliméricas das fibras acrílicas contêm, de um modo geral:

- mais de 85% (do peso das fibras) de unidades acrilonitrilo ( $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CN})-$ );
- Unidades com grupos ácidos em pequena percentagem, por vezes inferior a 1 %. Entre os comonómeros deste tipo encontram-se os ácidos acrílico, itacónico e estirenosulfónico;
- Grupos básicos na ordem dos 6 %. Os comonómeros mais usuais são vinilpiridina, acrilamida e etilenamina;
- Comonómero neutro entre 5 a 8 %. Os comonómeros são o acetato de vinilo e acrilato de metilo.

### *Estrutura supramolecular*

A fibra acrílica é um polímero altamente ordenado com apreciáveis forças electrostáticas entre os dipolos dos grupos nitrilo vizinhos da mesma molécula. Esta interacção intramolecular dificulta a rotação das ligações, aumentando a rigidez da molécula polimérica. Por esta razão o ponto de fusão é alto e não permite a dissolução nos solventes correntes (**13**).

Cada cadeia tende a manter-se dentro de um cilindro de 6 Å de diâmetro, mas os grupos nitrilo podem eventualmente sair do cilindro, como se pode ver nas figuras 13 e 14.

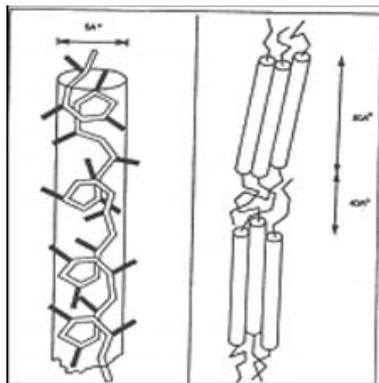


Fig. 13

Fig. 14

Fig. 13 - Modelo da cadeia de PAN em forma de hélice (**13**).

Fig. 14 - Agrupamento das cadeias e regiões amorfas (**13**).

Estes cilindros agrupam-se formando cristais com seis cadeias poliméricas. Estas cadeias mantêm-se unidas longitudinalmente através de ligações heteropolares entre átomos localizados nos grupos nitrilo de cadeias adjacentes (6). Estas interações intermoleculares são mais intensas nas zonas cristalinas que nas amorfas (19).

### **Propriedades tintoriais**

Inicialmente, o tingimento das fibras acrílicas era quase impossível. O tingimento a alta temperatura e o emprego de agentes aceleradores ou carriers não eram suficientes para obter resultados satisfatórios. Para tingir satisfatoriamente foi necessário modificar o polímero. Por isso, preparou-se copolímeros de acrilonitrilo com cerca de 5 a 10% de diversos monómeros, conseguindo aumentar a velocidade de difusão dos corantes. Alguns monómeros contêm grupos sulfónicos ou carboxílicos, e outros grupos com nitrogénio básico. As fibras resultantes podem ser tingidas a temperaturas próximas a 90°C sem ter de se adicionar um carrier ao banho de tingimento.

As diferenças na composição química e na estrutura supramolecular destas fibras traduziu-se numa ampla variedade de comportamentos tintoriais. Estas propriedades variam também com a temperatura de tratamento da fibra, tanto em meio seco como em meio húmido, durante o processo de fabricação.

### *Corantes catiónicos*

Uma fibra comercial pode ser tingida adequadamente com corantes catiónicos. O catião do corante absorvido na superfície da fibra fica com o seu potencial negativo neutralizado. Ao aumentar a temperatura, as moléculas de corante difundem-se no interior da fibra e reagem com os grupos ácidos do copolímero. A algumas temperaturas, o banho de tingimento tem um rápido esgotamento,

tornando necessário o emprego de retardadores catiónicos para se conseguir tingimentos mais uniformes.

Inicialmente os corantes catiónicos utilizados para as fibras acrílicas eram à base de cromogénios próprios, como o triarilmetano, tendo no entanto sido progressivamente substituídos por corantes catiónicos azo. Estes corantes podem por sua vez ser divididos em dois tipos conforme a carga se encontre ou não localizada.

### *Corantes dispersos*

Para além dos catiónicos, são também importantes os corantes dispersos. A pressões normais, só se conseguem cores claras e médias. As cores escuras são conseguidas tingindo a baixas pressões e temperaturas até 105°C.

### III - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1 - Materiais

##### 1.1 - Enzimas

Neste trabalho foram utilizadas três enzimas, lipase, protease e nitrilase tendo sido obtidas de empresas comerciais diferentes. A lipase (EC 3.1.1.3) de origem microbiana de *Candida rugosa* (tipo VII) foi adquirida comercialmente da SIGMA. A protease é uma alcalase 3.0T (EC 3.4.21.62) de *Bacillus globogii* (*Bacillus licheniformis*) e foi obtida comercialmente da NOVOZYME. A nitrilase Zyaneese (EC 3.5.5.1) foi adquirida à ZYLEPSIS.

Tabela 1. Características das enzimas comerciais usadas

	Origem	MW (Da)	Actividade Máxima Declarada (U/g <sub>sólido</sub> )
Lipase	<i>Candida rugosa</i>	10.000-12.000	12067
Protease	<i>Bacillus globogii</i>	27.300	1110
Nitrilase	(bacteriana)	-	1000

## 1.2 - Estabilizadores

Foi estudado o efeito da adição de alguns solventes e polióis que possam aumentar a estabilidade conformacional da enzima, de modo a torná-la activa num período de tempo mais longo. Para isso, determinou-se a actividade ao longo do tempo de cada enzima incubada com diferentes solventes.

### Lipase

O efeito dos solventes orgânicos e polióis na estabilidade da lipase foi determinado por incubação da solução enzimática nos seguintes aditivos: eritritol, etilenoglicol (EG), polietilenoglicol (PEG), d-sorbitol, xilitol e glicerol.

### Protease

O efeito dos polióis na estabilidade da protease foi determinado por incubação da solução enzimática nos seguintes aditivos: d-sorbitol, xilitol, etilenoglicol, polietilenoglicol e glicerol.

### Nitrilase

O efeito dos polióis na estabilidade da nitrilase foi determinado por incubação da solução enzimática nos seguintes aditivos: d-sorbitol, xilitol, etilenoglicol, polietilenoglicol e glicerol.

Tabela 2. Concentração a que cada aditivo foi adicionado

Aditivo	Concentração
d-Sorbitol	1 M
Xilitol	1 M
Etilenoglicol (EG)	1 M
Polietilenoglicol (PEG)	0,01 M
Glicerol	1 M
Eritritol	0,5 M

### 1.3 - Solventes das fibras sintéticas

Foi estudada a estabilidade das enzimas hidrolíticas em solventes que dissolvem ou abrem a estrutura da fibra de modo a facilitar a penetração da enzima no seu interior. Cada uma das enzimas foi incubada em dois solventes orgânicos adequados à fibra que hidrolisam e o efeito da concentração do solvente foi também estudado. Foi medida a actividade ao longo do tempo, de modo a calcular o tempo de meia-vida.

Tabela 3. Concentrações de solvente usado para cada fibra

Enzima	Solvente	Concentração (% v/v)
Lipase	Dimetilacetamida	4, 10 e 15
	Dimetilformamida	4, 10 e 15
Protease	Álcool benzílico	4, 10 e 15
	Dimetilformamida	4, 10 e 15
Nitrilase	Dimetilacetamida	4, 10 e 15
	Dimetilformamida	4, 10 e 15

### 1.4 - Tecido de fibra acrílica

O tecido de acrílica utilizado neste trabalho foi adquirido numa empresa local e possui as seguintes características:

Composição:	93% acrilonitrilo + 7% acetato de vinilo
Massa linear:	Fio de teia – 12 Tex Fio de trama – 12 Tex
Debuxo:	Tafetá
Nº fios:	36 / cm
Nº passagens:	36 / cm
Peso específico:	82 g/m <sup>2</sup>

## 1.5 - Corante

A fibra acrílica foi tingida com um 1% (v/p) de corante básico relativamente ao peso da fibra acrílica utilizada.

Corante básico – Azul de metileno

C.I. 52015

$C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot H_2O$  (Mr=373.90)

Analyticals Carlo Erba, RPE Reagente Puro Erba

## 1.6 - Equipamentos

A medição do pH foi efectuada utilizando um medidor de pH modelo pH 526 WTW MultiCal. Para determinação das actividades enzimáticas, as amostras foram incubadas em banho termostaticado com agitação modelo Grant OLS 200, e os ensaios colorimétricos realizados num espectrofotómetro modelo HÉLIOS  $\gamma$  da Unicam.

O tratamento enzimático da fibra acrílica foi efectuado no aparelho simulador de lavagens Rotawash e os tecidos tingidos no Ahiba Spectradye, Datacolor International. Os valores de K/S das amostras tingidas foram determinados com um espectrofotómetro de reflexão de marca Datacolor, Spectraflash 600 plus, numa gama de comprimentos de onda entre 360 a 700 nm.

## 2 - Métodos

### 2.1 - Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína solúvel foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (1976) que se baseia na mudança de cor da solução ácida do Coomassie Brilliant Blue G 250, quando se liga a uma proteína (a absorvância máxima muda de 465 nm para 595 nm).

Para preparação do reagente de Coomassie Blue adiciona-se 100 ml de ácido fosfórico (85%) a 50 ml de um solução de Coomassie 2 mg/ml em etanol (95%) e perfaz-se até 1000ml com água destilada. A 100  $\mu$ l da solução proteica a analisar adiciona-se 5 ml do reagente de Coomassie Blue e lê-se a densidade óptica a 595 nm, contra um branco preparado do mesmo modo mas com 100  $\mu$ l da solução tampão. O padrão de proteína utilizado foi Albumina Sérica Bovina (BSA 502 mg/L).

Na figura seguinte está representada a recta de calibração obtida, necessária para a determinação da concentração de proteína em solução.

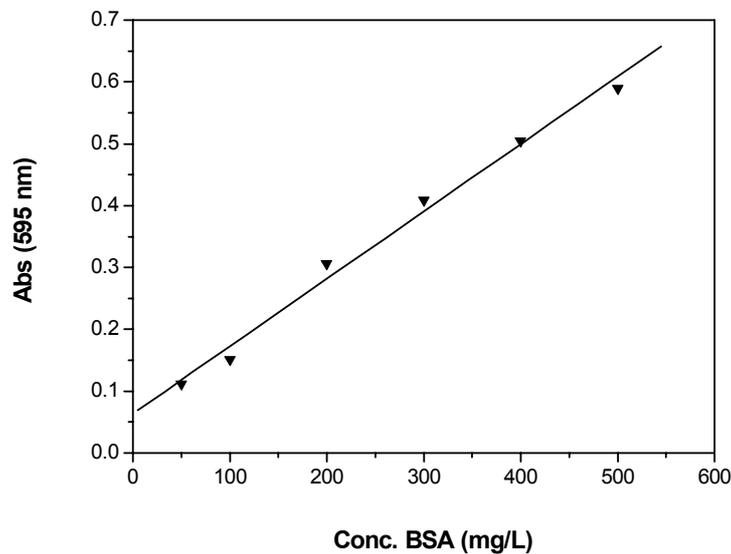


Figura 15. Recta de calibração e respectiva equação para determinação da proteína total a  $\lambda=595$  nm.

Equação de calibração:

$$\text{Conc. (mg/L)} = \frac{\text{Abs.} - (0,06341 \pm 0,01666)}{0,00109 \pm 0,00005}$$

com  $r^2=0,9900$

## 2.2 - Determinação das actividades enzimáticas

A actividade enzimática é expressa em Unidades por miligrama de proteína (símbolo “U”), em que 1 U é definida como a quantidade de preparação enzimática necessária para converter 1  $\mu\text{mol}$  de substrato a produto em 1 minuto, em condições definidas (tanto quanto possível óptimas) de pH, temperatura, concentração de substrato, etc..

$$1 \text{ U/mg}_{\text{Proteína}} = 1 \mu\text{mol}_{\text{Produto}}/(\text{min} \cdot \text{mg}_{\text{Proteína}})$$

Para as quatro enzimas recorreu-se a métodos de amostragem, pelo que as observações não foram feitas continuamente na mistura em que tinha lugar a reacção, mas em amostras que dela se retiraram ao longo do tempo. As amostras recolhidas foram analisadas através de métodos titulométricos ou espectrofotométricos.

### 2.2.1 - Actividade da lipase

O método adoptado para determinação da actividade lipase foi optimizado (Capítulo III 1) tendo como base o método desenvolvido por Trzcinska et. al (30).

A medição da actividade da lipase baseou-se na hidrólise do substrato p-nitrofenilpalmitato (p-NPP) com formação de p-nitrofenol (p-NPH), medido por absorção molecular a 400 nm. A solução de 8 mM de substrato em propanol foi adicionada na proporção de 1/20 (v/v) à solução tampão a 0,05 M pH 7,8 contendo 0,5 mM de ácido deoxicólico e 0,05% (p/v) de goma arábica. Adicionou-se a solução enzimática (lipase 0,01 mg/ml) na proporção de 1/20 (v/v) e incubou-se durante 15 minutos a 37°C. A reacção foi terminada com a adição de acetona, filtrou-se a solução e mediu-se o p-nitrofenol por espectrofotometria a 400 nm.

*Recta de calibração da concentração de produto*

Para o estudo das condições óptimas de determinação da actividade enzimática, foi necessário determinar a relação entre a concentração de produto formado e a respectiva absorção molecular a 400 nm. Para isso, realizou-se uma experiência sem substrato nem enzima, com todas as condições escolhidas anteriormente para o método, variando apenas a concentração de produto.

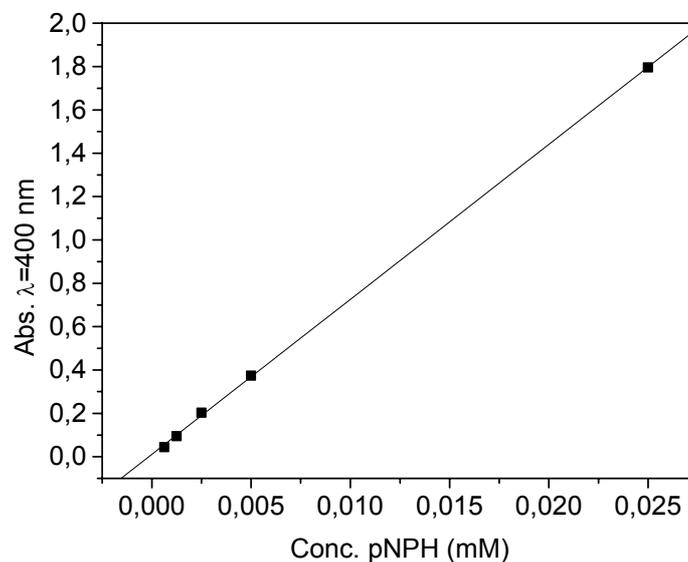


Figura 16. Recta de calibração e respectiva equação para determinação da concentração de produto p-NPH a pH 7,8 e 37°C.

Equação de calibração:

$$\text{Abs.} = (71,47556 \pm 0,5459) * \text{Conc}_{\text{p-NPH}}(\text{mM}) + (0,01101 \pm 0,00626)$$

com  $r^2=0,9998$

Após estudo do método, a actividade foi determinada com a solução de substrato em ácido deoxicólico e goma arábica. Assim, fez-se outra curva de calibração em que se adicionou estes produtos à solução.

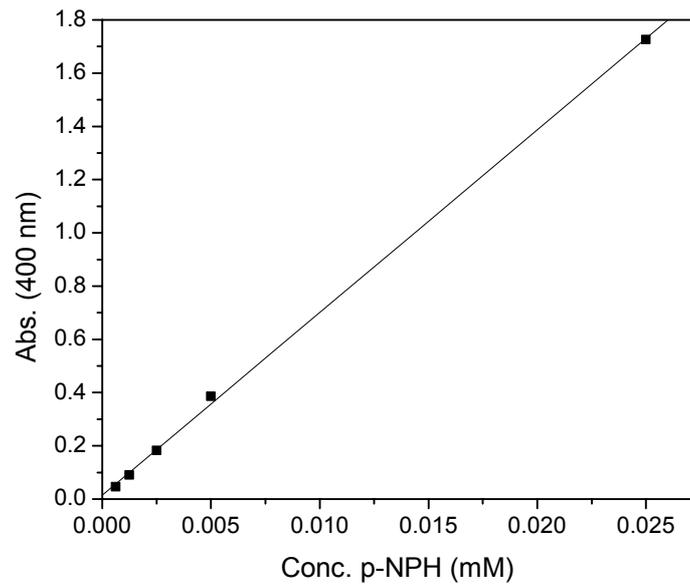


Figura 17. Recta de calibração e respectiva equação para determinação da concentração de produto p-NPH a pH 7,8 e 37°C.

Equação de Calibração:

$$\text{Abs.} = (68,65926 \pm 0,91794) * \text{Conc}_{\text{p-NPH}} \text{ (mM)} + (-0,01417 \pm 0,01053)$$

com  $r^2 = 0,9995$

### 2.2.2 - Actividade da protease

A hidrólise da caseína como substrato foi determinada através do aumento de tirosina, seguida por espectrofotómetro a 660 nm. A preparação enzimática foi incubada com a solução de substrato, a 37°C e pH 7.5.

Preparou-se uma solução de 0,65 % (p/v) de caseína em tampão fosfato 50 mM a pH 7,5 e 37°C. A 5 ml desta solução de caseína, adicionou-se 1 ml da solução enzimática diluída em tampão acetato de sódio 10 mM com 5 mM de acetato de cálcio. Depois de incubar a mistura a 37°C durante exactamente 10 min, adicionou-se 5 ml de ácido tricloroacético 110 mM para terminar a reacção. Esperou-se 30 minutos e filtrou-se a solução em papel de filtro. Na preparação do branco a solução enzimática só é adicionada após o ácido

tricloroacético. Para desenvolvimento da cor misturou-se 2 ml do filtrado com 5 ml de carbonato de sódio 500 mM e 1 ml de reagente Fenólico Folin Ciocalteu's. Incubou-se a 37°C durante 30 min e leu-se a absorvância a 660 nm.

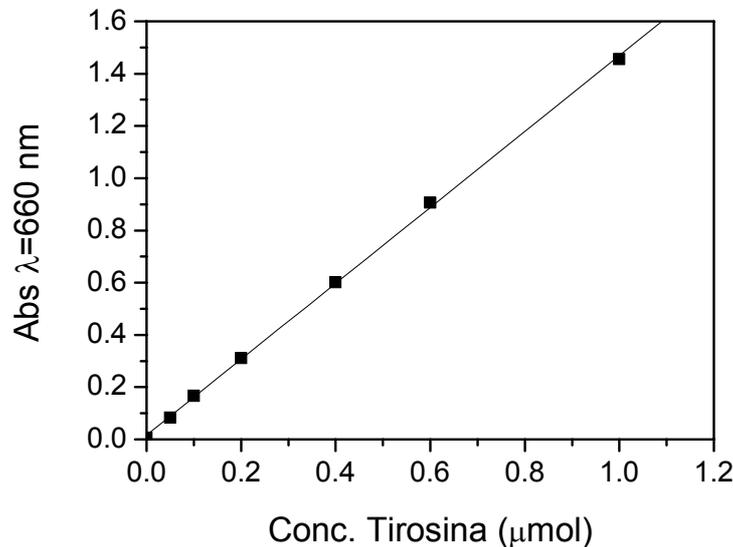


Figura 18. Recta de calibração e respectiva equação para determinação da concentração de produto (tirosina) a pH 7,5 e 37°C.

Equação de calibração:

$$\text{Abs.} = (1,4526 \pm 0,01324) * \text{Conc}_{\text{p-NPH}} \text{ (mM)} + (-0,01648 \pm 0,00628)$$

com  $r^2 = 0,9996$

### 2.2.3 - Actividade da Nitrilase

A solução enzimática foi incubada com a solução de substrato (benzonitrilo), a 30°C e pH 7,5. A formação de amónia devida à hidrólise do substrato foi medida com um kit de amónia da SIGMA. Este kit baseia-se na aminação redutiva de 2-oxoglutarato na presença da desidrogenase glutamato (GLDH) e NADPH reduzido. A diminuição da absorvância a 340 nm deve-se à oxidação de NADPH, proporcional à concentração de amónia de plasma.

Adicionou-se 100 µl de amostra a 1 ml de reagente de amónia (contém 3,4 mM de 2-oxoglutarato e 0,23 mM de NaDPH). Equilibrou-se durante 3 minutos a

temperatura entre 25 e 37°C e leu-se a absorvância a 340 nm. Adicionou-se 10 µl de solução de desidrogenase L-glutamato. Misturou-se e esperou-se 5 minutos. Absorvância foi lida novamente a 340 nm. A concentração de amónia é calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Amónia } (\mu\text{mol/ml}) = (\Delta\text{Abs}_a - \Delta\text{Abs}_b) \times \frac{1,11}{6,22 \times 0,1} \times D$$

Sendo,

$\Delta\text{Abs}_a$  - absorvância da amostra

$\Delta\text{Abs}_b$  – absorvância do branco

1,11 – volume total na cuvete

6,22 – Coeficiente de extinção NADPH

0,1 – volume da amostra na cuvete

D – diluição da amostra

## 2.3- Propriedades catalíticas das enzimas

### 2.3.1- Perfil de pH

O perfil de pH foi estudado para a lipase, protease e nitrilase. As actividades enzimáticas foram determinadas para vários valores de pH, mantendo-se inalteradas todas as outras condições, incluindo a temperatura. As soluções enzimáticas e de substrato foram preparadas com tampão de força iónica constante (4), mas para diferentes valores de pH.

Tabela 4 – Temperatura e gama de pH dos ensaios

Enzima	pH	T (°C)
Lipase	6-10	37
Protease	2-12	37
Nitrilase	7,5-10,6	30

### 2.3.2- Perfil de Temperatura

O efeito da temperatura foi avaliado para a lipase, protease e nitrilase, através da variação das actividades enzimáticas a diferentes temperaturas. O pH da solução e todas as outras condições foram mantidos constantes. A actividade enzimática foi medida após 10 minutos de incubação da solução de substrato a cada uma das temperaturas estudadas.

Tabela 5 – Condições de pH e gama de temperatura dos ensaios

Enzima	pH	T (°C)
Lipase	7,8	25-60
Protease	7,5	20-90
Nitrilase	7,8	20-60

### 2.3.3 - Estabilidade Enzimática

O efeito de alguns parâmetros, como a temperatura e a adição de solventes, na estabilidade das enzimas foram determinados por incubação da solução enzimática em tampão, nas referidas condições. As amostras foram retiradas ao longo do tempo, e mediu-se a respectiva actividade residual. A actividade de cada enzima foi medida de acordo com o procedimento descrito anteriormente em 2.2.

A estabilidade térmica foi estudada através do tempo de meia-vida da enzima ( $t_{1/2}$ ) nas condições estudadas (tempo que demora a perder 50 % da sua actividade enzimática inicial):

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d}$$

sendo  $K_d$  a constante de desactivação da enzima.

### *Estabilidade Térmica*

O efeito da temperatura ao longo do tempo na estabilidade das enzimas foi determinado por meio de incubação das diferentes enzimas a temperaturas diferentes, em tampão fosfato 50 mM. Para análise da estabilidade foi determinada a actividade de cada enzima, nas condições referidas, ao longo do tempo.

Tabela 6 – Gama de temperaturas estudadas para as diferentes enzimas

Enzima	pH	T (°C)
Lipase	7,8	4, 20, 30, 37 e 45

### *Efeito de aditivos na estabilidade enzimática*

O efeito da adição de solventes orgânicos e estabilizadores ao longo do tempo na actividade das enzimas foi determinado por meio de incubação das diferentes enzimas com aditivos a várias concentrações, em tampão fosfato 50 mM, nas condições de pH e temperatura mais estáveis.

Tabela 7 - Condições de pH e temperatura na incubação das enzimas

Enzima	pH	T (°C)
Lipase	7,8	37
Protease	7,5	30 ou 60
Nitrilase	7,8	30

## 2.4 - Tratamento Enzimático da Fibra Acrílica

Antes de se efectuar o tratamento enzimático da fibra acrílica, esta tem de ser tratada para remover os componentes da fase de acabamento ainda incorporados na fibra. Fez-se uma lavagem dos tecidos a tratar, durante 1 hora, em água com 1g/L de Calgon T a 60°C.

Seguiu-se o tratamento dos tecidos com 1g/L de nitrilase em solução tampão fosfato 50 mM a pH 7,8. O tecido foi tratado usando uma relação de banho de 1:40. O tratamento enzimático foi efectuado a 30°C com agitação, durante 116 horas (~ 5 dias). Foram realizados dois tratamentos enzimáticos; a um deles foi adicionada enzima à solução tampão e ao outro além da enzima foi também adicionado 1M de sorbitol e 4% (v/v) de dimetilacetamida. Foi feito o controlo incubando a amostra em solução tampão sem a enzima, durante o mesmo tempo e nas mesmas condições de pH e temperatura.

De seguida ao tratamento enzimático efectuou-se uma lavagem apropriada dos tecidos; primeiro em água corrente, e depois pela passagem sucessiva em água aquecida a 60°C com 2 L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 g/L), durante 1 hora.

## 2.5 - Determinação da perda de peso

A perda de peso nos tecidos devida ao tratamento enzimático foi obtida como sendo a diferença de peso das amostras após a primeira lavagem e após o tratamento enzimático e lavagem final. As amostras foram pespontadas, secas na estufa a 60°C durante 3h, condicionadas durante 30 minutos em exsiccador e pesadas. Foram postas novamente na estufa durante 30 minutos pesadas e condicionadas durante 30 minutos no exsiccador repetindo-se o processo até se obter peso constante entre pesagens (considerou-se como peso constante diferenças entre pesagens menores ou iguais a 5%).

## 2.6 - Tingimento

Os tecidos de acrílica que sofreram os três tipos de tratamentos foram tingidos usando uma relação de banho 1:100, com um corante básico, usando 1% o.w.f. Os tecidos tratados foram tingidos a 70°, 80°, 90° e 110°C (o tecido tratado enzimaticamente com sorbitol e DMA não foi tingido a 80°C). O Ahiba foi programado para fornecer um aumento de 4°C por minuto, até atingir a temperatura desejada mantendo-a durante 75 minutos. O tingimento foi efectuado a 30 rotações por minuto.

## 2.7 - Determinação do valor de reflectância

O controlo da qualidade dos tingimentos efectuados foi feito comparando a reflectância das amostras tingidas medida com um espectrofotómetro de reflexão. Este aparelho determina os valores de K/S para comprimentos de onda na zona do visível, avaliando desta forma o aumento ou diminuição da cor. A reflectância é relacionada com a concentração de corante na fibra através da fórmula de Kubelka-Munck (20):

$$\frac{K}{S} = \frac{(1 - R)^2}{2R}$$

sendo:

R – reflectância;

K – coeficiente de absorção do meio;

S – coeficiente de difusão do meio.

Os valores de K/S foram obtidos directamente com o espectrofotómetro utilizado.

## 2.8 - Tratamento Estatístico de Dados

De um modo geral, a estatística é um conjunto de métodos de recolher, resumir e apresentar, analisar e interpretar dados. Assim, um conjunto de observações de uma experiência aleatória, deve ser analisado e interpretado de modo a tirar conclusões sobre as observações.

Põe-se então o problema de “estimar” o valor do parâmetro desconhecido. Tal estimação deve ser feita determinando um “intervalo de confiança” para o parâmetro desconhecido, i.e., um intervalo (cujos extremos são estatísticas) que contenha o valor desse parâmetro com uma determinada probabilidade (22).

### Cálculo de Erros

Para cada série de medições, num ensaio, foi determinada:

Média Aritmética  $\bar{x}$

$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n}$$

Cálculo do erro associado à média:

Desvio padrão

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{x} - x_i)^2}{n-1}}$$

sendo n o número de repetições da amostra e  $X_i$  o valor da variável.

O resultado final pode ser representado por:

$$\mu = \bar{x} \pm t(\sigma / \sqrt{n})$$

em que o t de Student se encontra tabelado (tabelas de Fisher) em função de (n-1), os graus de liberdade, e do nível (percentagem) de confiança pretendido.

No presente trabalho calculou-se o resultado com um intervalo de 95% de confiança. Como todas as experiências foram feitas em triplicado o grau de liberdade (n-1) é sempre 2.

*Regressão Linear*

Para o cálculo dos coeficientes a e b da recta  $y = ax + b$ , utilizaram-se as fórmulas

$$a = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

$$b = \bar{y} - a\bar{x}$$

Determinação dos erros associados aos coeficientes a e b

Desvio padrão

$$\sigma_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n - 2}}$$

Variância

$$\sigma_a^2 = \frac{n S_{y/x}^2}{n \sum_i x_i^2 - \left( \sum_i x_i \right)^2}$$

$$\sigma_b^2 = \frac{S_{y/x}^2 \sum_i x_i^2}{n \sum_i x_i^2 - \left( \sum_i x_i \right)^2}$$

Então, a equação da recta escreve-se da seguinte forma:

$$y = ( a \pm t \sigma_a ) x + ( b \pm t \sigma_b )$$

Sendo o *t de Student* referido a (n-2) graus de liberdade e nível de confiança pretendido, e  $t\sigma_a$ ,  $t\sigma_b$  são os intervalos de confiança dos parâmetros a e b.

*Cálculo do coeficiente de correlação, r*

O valor de coeficiente de correlação, r, dá uma estimativa de como os valores experimentais se ajustam a uma recta. Deve ser próximo de +1, para declives positivos, e de -1, para negativos.

$$r = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \sum_i (y_i - \bar{y})^2}}$$

## IV - RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO

### 1- Método para Determinação da Actividade da Lipase

#### *Desenvolvimento do Método*

O método adoptado para determinação da actividade enzimática da lipase teve como base o método desenvolvido por Trzcinska *et al.* (30), o qual foi optimizado tendo em vista uma maior reprodutibilidade dos resultados.

Algumas informações necessárias para determinação da actividade não eram conhecidas tais como as rectas de calibração do produto apresentada no capítulo III desta tese (figuras 16 e 17) e a variação da quantidade de produto formado com a concentração de enzima, apresentada na figura 18. Para optimizar o método fez-se o estudo da melhor correlação dos resultados filtrando e centrifugando as amostras (figura 19) e do efeito do solvente orgânico (figura 20).

*Centrifugação vs. Filtração*

O método em que nos baseamos para determinação da actividade da lipase não apresentava elevada reprodutibilidade dos resultados, devido à existência de colóides em solução que interferem na leitura da absorvância. Esta interferência pode ser eliminada por remoção dos colóides através de filtração ou centrifugação das amostras, dependendo do tamanho das partículas que se encontram em suspensão. Assim, para estudo do seu efeito (Figura 19) procedeu-se à centrifugação e filtração das amostras antes da determinação de produto formado, por absorção molecular.

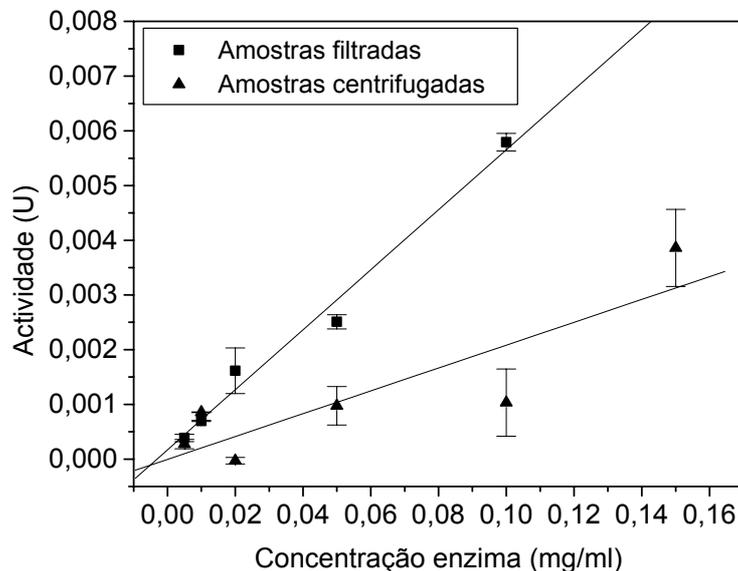


Figura 19. Efeito de centrifugação e filtração.

Aproximaram-se os valores experimentais a duas rectas lineares, uma para cada ensaio, amostras filtradas e centrifugadas. As equações das rectas obtidas, com o respectivo erro, foram as seguintes:

Amostras centrifugadas

$$y=(0,02088\pm 0,0584)x-(0,04147\pm 4,493)\cdot 10^{-4} \text{ com } r^2=0,7616$$

Amostras filtradas

$$y=(0,05484\pm 0,00406)x+(1,707\pm 2,072)\cdot 10^{-4} \text{ com } r^2=0,9838$$

A aproximação dos pontos experimentais a uma recta tem maior coeficiente de correlação para as amostras filtradas que para as centrifugadas. Pode-se concluir que os colóides em suspensão são de tamanho reduzido, não removidos por centrifugação. O processo de filtração removeu as partículas mais pequenas, usando-se um filtro de tamanho apropriado. Para maior reprodutibilidade dos resultados deve ser efectuada a filtração das amostras antes de determinada a absorção molecular.

### *Varição da Concentração de Enzima*

A determinação da actividade enzimática deve ser feita utilizando uma concentração de enzima em que a formação de produto seja proporcional a essa concentração, ou seja não deve haver saturação de enzima. Assim, determinou-se em primeiro lugar, a quantidade de produto formado para várias concentrações de enzima em solução (figura 20), de modo a encontrar a gama de concentração de enzima em que a formação de produto lhe é proporcional. Trabalhando-se com a solução enzimática a uma concentração abaixo do limite máximo dessa gama garante-se a não saturação de enzima em solução.

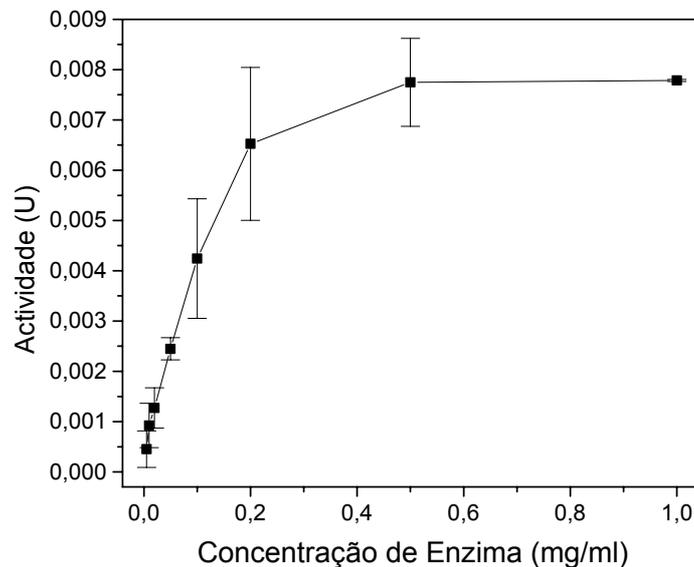


Figura 20. Quantidade de produto (p-NPH) formado em função da quantidade de enzima na solução a pH 7,8 e 37°C.

A concentração de enzima não deve ser superior a 0,1 mg/ml, pois acima deste valor a formação de produto deixa de ser directamente proporcional à concentração de enzima, ou seja, existe saturação da enzima.

Nas experiências posteriores foi usada a preparação enzimática com concentração 0,05mg<sub>enzima</sub>/ml, de modo a haver maior confiança nos resultados.

### *Efeito de solvente orgânico*

A determinação experimental da actividade enzimática da lipase pode apresentar problemas devido à hidrofobicidade do substrato. Ao adicionar o substrato e a enzima em sistemas aquosos formam-se duas fases. Este inconveniente foi ultrapassado com a adição de um solvente como o propanol facilitando o acesso da enzima ao substrato. Foi estudado o efeito do solvente propanol na solução de substrato, e sua concentração, de modo a favorecer a hidrólise do substrato. Foram realizadas 4 experiências (Figura 21), com solução de substrato a diferentes concentrações de propanol de 2,5 %, 3,75 %, 5 % e 10 % (v/v).

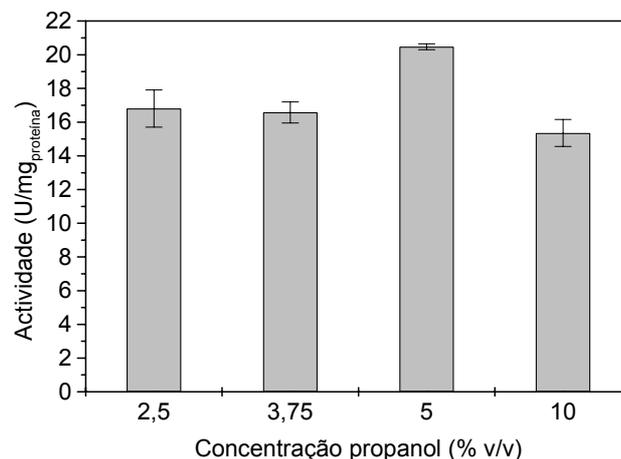


Figura 21. Efeito da concentração de propanol na actividade da lipase.

A actividade enzimática foi melhorada na presença de propanol. Pequenas quantidades de solvente induziram um aumento significativo da actividade

enzimática. A hidrólise de substrato foi máxima no ensaio em que se adicionou 5% (v/v) de propanol à solução de substrato.

## 2 - Caracterização das Enzimas

### 2.1 - Determinação da concentração em proteína

As enzimas foram distribuídas comercialmente no estado sólido, sem conhecimento do seu conteúdo proteico. A concentração de proteína em cada uma das enzimas foi determinada pelo método de Bradford (tabela 8).

Tabela 8 – Concentração de proteína

Enzima	Concentração de Proteína (mg <sub>Proteína Total</sub> /g <sub>Sólido</sub> )
Lipase	18,5
Protease	20,2
Nitrilase	37,8

As três enzimas estudadas, lipase, protease e nitrilase, apresentam um conteúdo proteico da mesma ordem de grandeza.

### 2.2 - Perfis de pH e Temperatura

#### 2.2.1 - Lipase

As enzimas são muito activas em solução numa pequena gama de pH, com um pH óptimo correspondente à actividade máxima (Figura 22). A actividade da enzima lipase foi medida a uma temperatura constante de 37°C, em solução tampão de força iónica constante (4) a pH entre 4 e 10.

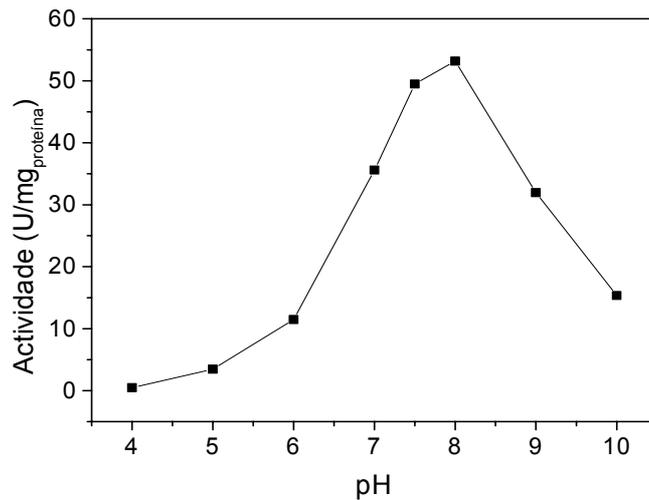


Figura 22. Perfil de pH da lipase a 37°C.

A lipase apresenta actividade máxima em solução tampão a pH entre 7,5 e 8. Para valores de pH mais baixos e mais altos, a actividade da enzima é reduzida consideravelmente. Em solução tampão a pH entre 7 e 9, a lipase retém apenas cerca de 60% da actividade inicial obtida a pH 8.

A actividade enzimática inicial da lipase depende também da temperatura a que a reacção ocorre. O efeito da temperatura na actividade inicial da lipase *Candida rugosa* foi estudado em solução de tampão fosfato a pH 7,8 (contido no intervalo de pH óptimo) e temperatura entre 25° e 60°C (Figura 23).

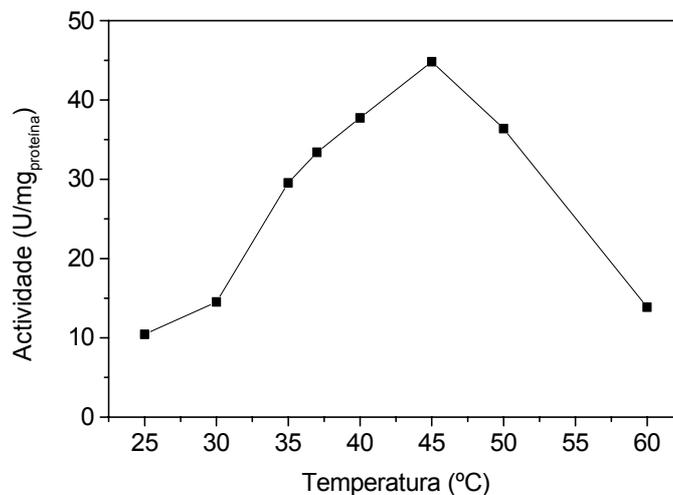


Figura 23. Perfil de temperatura da lipase em tampão fosfato a pH 7,8.

A actividade da lipase aumenta progressivamente com a temperatura até 45°C, em que a hidrólise de substrato é máxima. A temperatura superior, a actividade inicial diminui. Em solução a temperatura entre 37° e 50°C, a lipase retém mais de 70% da actividade inicial obtida a 45°C.

### 2.2.2 - Protease

A figura seguinte mostra o perfil de pH da enzima protease a uma temperatura constante de 37°C. A solução de substrato foi incubada em solução tampão de força iónica constante (4) a pH entre 2 e 12.

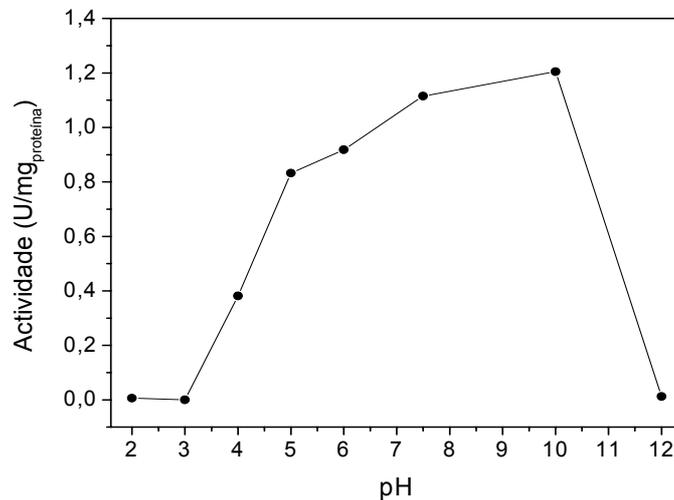


Figura 24. Efeito do pH na actividade da protease a 37°C.

A protease retém mais de 60% da sua actividade inicial máxima em solução a pH entre 5 e 10. A hidrólise de substrato é aproximadamente constante e máxima em solução tampão a pH entre 7,5 e 10. No entanto, a partir deste valor de pH, a actividade diminui rapidamente. A pH inferior a 3 e superior a 12 não é detectada actividade residual.

O efeito da temperatura na protease foi estudado em solução de tampão fosfato a pH constante de 7,5 e incubada a temperaturas entre 20° e 90°C (Figura 25).

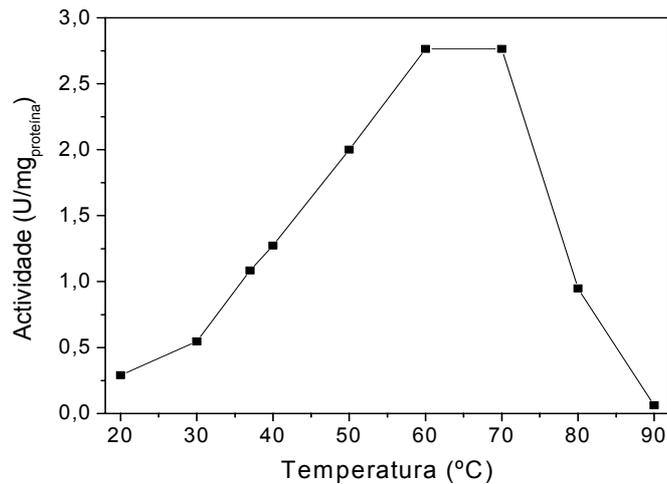


Figura 25. Efeito da temperatura na actividade da protease a pH 7,5.

A formação de produto foi máxima em solução incubada entre 60° e 70°C. A temperatura superior a actividade inicial da protease diminui rapidamente, não apresentando actividade residual a 90°C. A protease retém cerca de 70% da actividade inicial máxima numa gama de temperatura entre 45° e 75°C.

### 2.2.3 - Nitrilase

Para o estudo do perfil de pH da nitrilase (Figura 26), a actividade inicial foi determinada para a enzima e substrato incubados em solução tampão de força iónica constante (4). Estudou-se o efeito da variação de pH entre 4,5 e 10,6 a uma temperatura constante de 30°C.

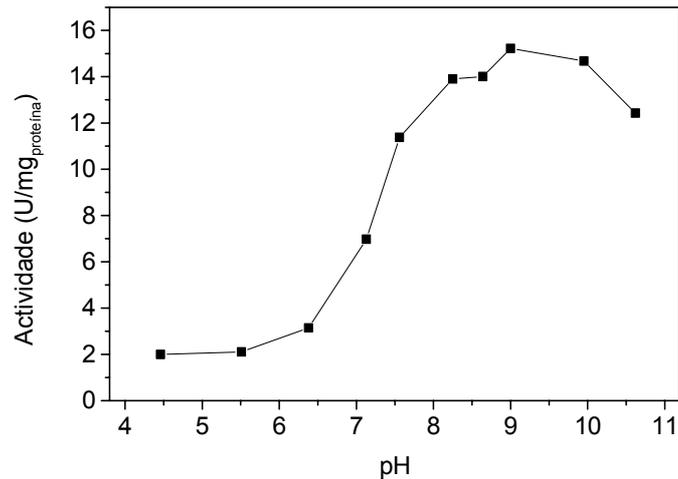


Figura 26. Efeito do pH da solução na actividade inicial da nitrilase.

A actividade máxima da nitrilase foi observada em solução a pH próximo de 9 (entre 8 e 10). É muito activa numa grande gama de pH, retendo mais de 75% da sua actividade inicial máxima entre pH 7,5 e 10,6. A pH inferior a 6,5 a actividade residual é muito baixa, próxima de 20% do valor da actividade máxima.

O efeito da temperatura entre 20° e 60°C na actividade inicial enzimática foi estudado para a enzima nitrilase em tampão fosfato a pH 7,8 com propanol, ácido deoxicólico e goma arábica (Figura 27).

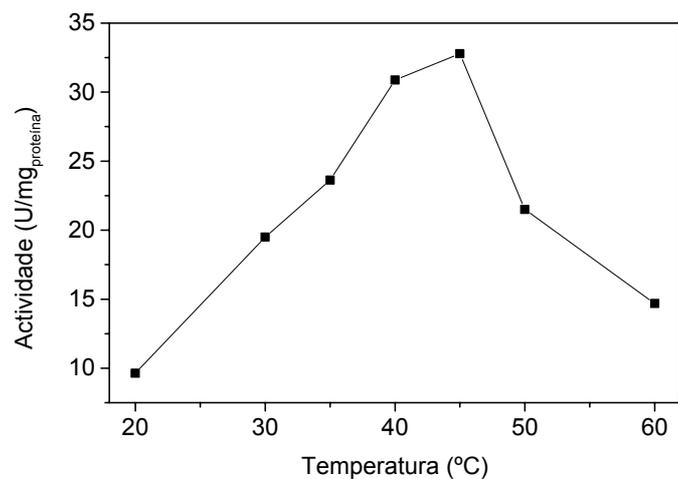


Figura 27. Efeito da temperatura na actividade da nitrilase.

A actividade inicial da enzima nitrilase aumenta progressivamente com a temperatura, atingindo a sua actividade máxima aos 45°C (45 U/mg<sub>proteína</sub>). À temperatura de 60°C a enzima retém ainda 45% da sua actividade máxima. A 30°C a nitrilase apresenta uma actividade de 27 U/mg<sub>proteína</sub>, aproximadamente igual à actividade máxima declarada a esta temperatura (26,43 U/mg<sub>proteína</sub>). É de salientar o facto da enzima reter cerca de 30% da sua actividade à temperatura de 20°C.

#### 2.2.4 - Resumo

As enzimas podem ser facilmente desnaturadas por pequenas alterações de temperatura e pH, sendo por isso necessário fazer o estudo do seu comportamento a estas variações. O efeito adverso de pequenas mudanças das condições ambientais, na actividade enzimática encontra-se descrito na literatura (24, 25).

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

Na tabela seguinte são apresentados o valor de concentração de proteína nas enzimas comercializadas e as condições de pH e temperatura a que se verifica maior velocidade de reacção hidrolítica.

Tabela 7– Resultados obtidos experimentalmente para as três enzimas

	Conc. Proteína (mg <sub>Proteína</sub> /g <sub>Sólido</sub> )	Cond. Óptimas Actividade Inicial	
		pH	T (°C)
Lipase	18,5	7,5-8,0	40-45
Protease	20,2	7,5-10	60-70
Nitrilase	37,8	8,0-10,0	40-45

A actividade enzimática máxima da lipase verifica-se apenas para valores de pH entre 7,5 e 8. Em solução a pH entre 7 e 9, a nitrilase retém apenas 60% da hidrólise máxima de substrato. A protease é essencialmente activa entre pH 7,5 e 10, mantendo 70% da sua actividade máxima entre pH 8 e 10. Relativamente ao efeito do pH em solução, a nitrilase destaca-se positivamente, entre as três enzimas estudadas. A sua actividade enzimática inicial é máxima para a gama de valores mais alargada, entre 8 e 10. A hidrólise de substrato é reduzida menos de 25% em solução a pH entre 7,5 e 10,6.

A actividade inicial máxima da lipase é conseguida a temperaturas entre 40° e 45°C, mantendo 70% da actividade entre 37° e 50°C. A protease é a enzima que apresenta maior estabilidade a variações da temperatura do meio em que se encontra. A actividade inicial é máxima entre 60° e 70°C, temperaturas estas mais elevadas que para as outras enzimas. A protease retém 70% da hidrólise máxima de substrato a temperaturas entre 45° e 75°C. A actividade inicial máxima da enzima nitrilase verifica-se numa gama pequena de temperatura, entre 40° e 45°C. A nitrilase retém 60% da sua actividade inicial em solução a temperatura entre 30° e 50°C.

### 3 - Estabilidade Enzimática

A diminuição da actividade das enzimas estudadas obedece a um modelo exponencial de desactivação, devido à reacção de hidrólise do substrato ser uma reacção de 1ª ordem. O efeito da temperatura, dos solventes orgânicos e de estabilizadores em cada uma das enzimas foi estudado por comparação dos respectivos tempos de meia-vida com os diferentes aditivos. O tempo de meia-vida é aquele em que a enzima ainda retém 50% da actividade inicial. A diminuição exponencial é seguida pela equação de desactivação:

$$A = A_0 \cdot \exp(-k_d \cdot t)$$

$$t_{1/2} = \ln(2)/k_d \text{ (50\% de actividade inicial)}$$

### 3.1 - Lipase

#### *Efeito da Temperatura*

O efeito da temperatura na estabilidade da enzima foi estudado para as temperaturas de 4, 20, 30, 37 e 45°C. Na figura seguinte apresentam-se os coeficientes de desactivação térmica calculados para cada temperatura.

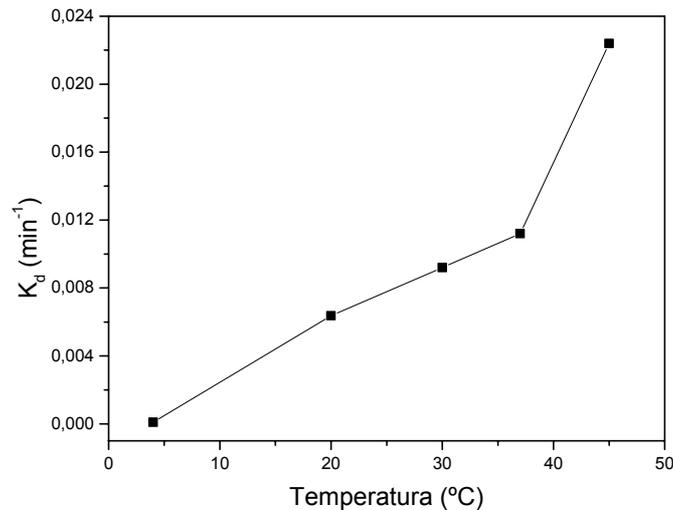


Figura 28. Coeficiente de desactivação térmica em função da temperatura.

A temperaturas superiores a 37°C o aumento do valor de desactivação térmica é mais acentuado, deixando de ser proporcional à temperatura. Como a desactivação da enzima é maior a temperaturas elevadas, aconselha-se que a temperatura de operação seja no máximo 37°C, mesmo tendo-se verificado anteriormente a temperatura óptima entre 40° e 45°C.

#### *Efeito de estabilizadores*

Foram estudados vários estabilizadores, para determinar o seu efeito na estabilidade da enzima a pH 8 e 37°C. O efeito dos solventes orgânicos e polióis na estabilidade térmica da lipase (Tabela 1) foi estudado por determinação da actividade após incubação da solução enzimática nos

seguintes aditivos: eritritol, etilenoglicol, polietilenoglicol, d-sorbitol, xilitol e glicerol.

Tabela 8. Efeito de solventes e polióis na estabilidade da lipase. A actividade foi medida em substrato pNPP preparado em tampão fosfato a pH 8 e 37°C. O controlo da amostra sem aditivos apresenta actividade inicial de 55 U/mg<sub>proteína</sub> e tempo de meia-vida de 1 hora

Aditivos		Actividade Inicial (%)	Tempo de Meia-Vida (%)
Lipase sem aditivo		100	100
Eritritol	0,5 M	125	162
Etilenoglicol (EG)	1 M	117	99
Polietilenoglicol (PEG)	10% m/v	125	517
d-Sorbitol	1 M	117	586
Xilitol	1 M	123	554
Glicerol	1 M	92	261

À excepção do etilenoglicol, todos os aditivos estudados melhoraram a estabilidade da enzima lipase. O etilenoglicol que manteve o mesmo tempo de meia-vida que a enzima sem aditivos. Os melhores estabilizadores foram o polietilenoglicol, o xilitol, e principalmente o sorbitol que aumentou o tempo de meia-vida aproximadamente 5 vezes.

A actividade inicial da lipase aumentou pouco com a adição dos estabilizadores, com excepção da adição de 1 M de glicerol que diminuiu 8% a actividade inicial. O aumento máximo da actividade inicial, 25 %, verificou-se para a adição de 0,5 M de eritritol.

#### *Efeito de solventes orgânicos*

Foi estudada a estabilidade da lipase *Candida rugosa* em solventes orgânicos que abrem a estrutura da fibra de modo a facilitar a penetração da enzima no seu interior (Tabela 9). Incubou-se a solução enzimática em dimetilacetamida (4, 10 e 15 % v/v) e dimetilformamida (3 e 10 % v/v)

Tabela 9. Efeito de solventes orgânicos na actividade da lipase. A actividade foi medida em substrato pNPP preparado em tampão fosfato a pH 8 e 37°C. Os valores de actividade inicial e tempo de meia-vida são apresentados relativamente à amostra controlo sem aditivos, 55 U/mg<sub>proteína</sub> e 1 hora, respectivamente

	DMA (v/v)			DMF (v/v)	
	4 %	10 %	15 %	3 %	10 %
Actividade Inicial	96	93	89	75	73
Tempo de Meia-Vida	96	72	64	91	45

A incubação da solução contendo lipase com os dois solventes estudados, DMA e DMF, teve um efeito negativo na velocidade inicial de hidrólise do substrato e na estabilização desta ao longo do tempo.

A actividade inicial da lipase não é significativamente afectada quando incubada com DMA mesmo nas concentrações mais elevadas de 15% (v/v). Incubando a solução com DMF o comportamento é diferente, verificando-se pela tabela anterior um decréscimo de 25% do valor da actividade inicial, quando a enzima é incubada com apenas 3% (v/v) de DMF.

A estabilidade da enzima também não é afectada pela sua incubação com DMA a concentração até 4% (v/v), mas com 10% (v/v) de DMF verifica-se uma diminuição do tempo de meia-vida para menos de metade do valor máximo. O solvente que menos interfere com a enzima é a DMA, mas só deve ser adicionada em pequenas quantidades, de modo a que o seu efeito negativo não seja significativo.

#### *Efeito de solventes orgânicos e estabilizadores*

Através da tabela 8 verificou-se que os aditivos que aumentam a estabilidade enzimática ao longo do tempo são os polióis sorbitol e xilitol. Assim, para cada um destes três aditivos foi estudada a influência na estabilidade enzimática, conjuntamente com dimetilacetamida ou dimetilformamida (Tabela 10).

Tabela 10. Efeito de solventes orgânicos e estabilizadores na actividade da lipase. A actividade foi medida em substrato pNPP preparado em tampão fosfato a pH 8 e 37°C. Os valores de actividade inicial e tempo de meia-vida estão expressos relativamente aos valores da amostra controlo sem aditivos, sendo 55 U/mg<sub>proteína</sub> e 1 hora, respectivamente

10.a)

	Actividade inicial (%)					
	DMA (% v/v)			DMF (% v/v)		
	4	10	15	4	10	15
PEG (10% m/v)	98	93	83	109	85	68
Sorbitol (1 M)	80	71	75	91	63	44
Xilitol (1 M)	82	66	51	80	61	50

10.b)

	Tempo de meia-vida (%)					
	DMA (% v/v)			DMF (% v/v)		
	4	10	15	4	10	15
PEG (10% m/v)	171	140	135	154	143	134
Sorbitol (1 M)	253	256	178	149	194	155
Xilitol (1 M)	196	172	164	190	172	173

O efeito mais positivo na estabilização enzimática verificou-se para a adição de 1M de sorbitol e 4 a 10% (v/v) de dimetilacetamida. Estes resultados estão de acordo com os anteriores estudos isolados do efeito dos estabilizadores e dos solventes orgânicos.

### 3.2 - Protease

#### *Efeito de estabilizadores*

Foi estudado o efeito de alguns aditivos conhecidos como estabilizadores, tais como sorbitol, xilitol, polietilenoglicol, etilenoglicol e glicerol (tabela 11), na actividade e estabilização da protease. Para isso, a enzima foi incubada nos

referidos aditivos a pH 7,5 e 37°C, e a actividade determinada ao longo do tempo.

Tabela 11. Valores de actividade inicial e tempo de meia-vida da protease para estudo do efeito de estabilizadores. A actividade foi medida em solução tampão a pH 7,5 e 37°C. A amostra controlo sem aditivos apresentou uma actividade inicial de 60 U/mg<sub>proteína</sub> e tempo de meia-vida de 15 dias

Aditivos		Actividade inicial (%)	Tempo de meia-vida (%)
Protease sem aditivo		100	100
d-Sorbitol	1 M	90	159
Xilitol	1 M	93	123
PEG	10 % m/v	29	98
EG	1 M	97	99
Glicerol	1 M	94	648

A adição dos estabilizadores não teve um efeito significativo na velocidade inicial de hidrólise do substrato, à excepção de polietilenoglicol que diminuiu 73% a actividade, relativamente ao tempo de meia-vida sem aditivos. O mesmo não se pode concluir para a estabilização enzimática, pois foi melhorada com a incubação da solução em alguns dos estabilizadores estudados.

A actividade inicial da enzima incubada com os diferentes estabilizadores, exceptuando com a adição de PEG, não foi modificada significativamente (< 10%), relativamente ao valor sem incubação da enzima em aditivos. Através da tabela anterior verifica-se que os aditivos que aumentaram o tempo de meia-vida foram o sorbitol, xilitol e glicerol. Destes, o melhor estabilizador da actividade da protease foi o glicerol.

#### *Efeito de solventes orgânicos*

Foi estudado o efeito de dois solventes orgânicos, DMF e álcool benzílico, na estabilidade da protease (tabela 12), de modo a determinar o solvente que

afecta menos a enzima. Foi também analisada a relação entre a concentração de solvente adicionado e a estabilização da protease.

Tabela 12. Efeito da DMF e álcool benzílico na actividade da protease. A actividade foi medida em solução tampão a pH 7,5 e 60°C. A amostra controlo sem aditivos apresentou uma actividade inicial de 60 U/mg<sub>proteína</sub> e tempo de meia-vida de 5,9 horas

	DMF (% v/v)			Álcool Benzílico (% v/v)		
	4	10	15	4	10	15
Actividade inicial (%)	116	128	136	88	80	71
Tempo de meia-vida (%)	90	63	28	5	2	2

O solvente álcool benzílico não pode ser adicionado à enzima, pois desnatura-a, perdendo toda a actividade em poucos minutos. Mesmo quando adicionado em quantidades de 4% v/v, o álcool benzílico diminui o tempo de meia-vida a 5% do valor da enzima sem aditivos. A dimetilformamida adicionada em pequenas quantidades (até 4% v/v) não afecta significativamente a estabilidade da enzima. A actividade inicial da protease aumenta com a adição de DMF. Estes dois factores fazem com que o solvente DMF possa ser adicionado até 4% v/v sem ter um efeito negativo significativo na actividade da enzima.

#### *Efeito de Estabilizadores e Solventes*

Dos resultados anteriores (tabela 11) conclui-se que os aditivos que aumentam a estabilidade enzimática ao longo do tempo são o glicerol, sorbitol e xilitol. Foi efectuado um estudo do efeito conjunto do aditivo que induz maior estabilização, o glicerol, com os solventes orgânicos já estudados isoladamente. Assim, para este aditivo, glicerol, foi estudada a influência na estabilidade enzimática, conjuntamente com dimetilformamida e álcool benzílico.

Tabela 13. Efeito do glicerol com DMF ou álcool benzílico na actividade e estabilidade da protease a pH 7,5 e 60°C. Os valores da actividade inicial e do tempo de meia-vida

da protease estão expressos relativamente ao valor da amostra sem aditivos, sendo  $60 \text{ U/mg}_{\text{proteína}}$  e 5,9 horas, respectivamente

	DMF (% v/v)			Álcool Benzílico (% v/v)		
	4	10	15	4	10	15
Actividade inicial (%)	99	121	126	82	73	76
Tempo de meia-vida (%)	633	475	518	228	119	85

### 3.3. Nitrilase

#### *Efeito de estabilizadores*

O efeito dos solventes orgânicos e polióis na estabilidade térmica da nitrilase (Tabela 14) foi determinado por incubação da solução enzimática nos aditivos e posterior determinação da actividade. Na tabela seguinte são apresentados os valores relativos ao efeito de sorbitol, xilitol, polietilenoglicol, etilenoglicol e glicerol na actividade inicial e estabilidade da nitrilase. As experiências foram realizadas a  $30^{\circ}\text{C}$  e pH 7,5, atendendo à informação fornecida pela empresa que comercializa a enzima nitrilase (gama de estabilidade enzimática máxima entre a temperatura ambiente e  $35^{\circ}\text{C}$  e pH entre 7 e 8).

Tabela 14. Valores da actividade inicial e do tempo de meia-vida da nitrilase para estudo do efeito de estabilizadores na sua actividade. A actividade foi medida em solução tampão pH 7,5, a  $30^{\circ}\text{C}$ . A amostra controlo sem aditivos apresenta actividade inicial de  $16 \text{ U/mg}_{\text{proteína}}$  e tempo de meia-vida de 15 horas

Aditivos		Actividade inicial (%)	Tempo de meia-vida (%)
Nitrilase sem aditivo		100	100
d-Sorbitol	1 M	122	294
Xilitol	1 M	95	66
PEG	10 % m/v	121	62
EG	1 M	107	160
Glicerol	1 M	122	101

*Efeito de solventes orgânicos*

Foi estudada a estabilidade da Nitrilase incubada em solventes orgânicos (dimetilacetamida e dimetilformamida) que dissolvem ou abrem estrutura da fibra de modo a facilitar a penetração da enzima no seu interior (Tabela 15).

Tabela 15. Valores da actividade inicial e do tempo de meia-vida da nitrilase incubada com diferentes concentrações de DMA e DMF. A actividade inicial de uma unidade corresponde a 16 U/mg<sub>proteína</sub> e o tempo de meia-vida a 15h

	DMA (% v/v)			DMF (% v/v)		
	4	10	15	4	10	15
Actividade inicial (%)	84	89	86	87	78	59
Tempo de meia-vida (%)	90	55	19	30	19	9

Os dois solventes, DMA e DMF, desactivam a enzima, diminuindo a sua estabilidade e actividade inicial. O solvente com menos efeitos negativos é a DMA que pode ser usada em concentrações menores que 4% (v/v).

*Efeito de estabilizadores e solventes orgânicos*

Através do quadro anterior verificou-se que os aditivos que aumentam a estabilidade enzimática ao longo do tempo são o sorbitol e etilenoglicol. Assim, para cada um destes três aditivos foi estudada a influência na estabilidade enzimática, conjuntamente com dimetilacetamida a três concentrações diferentes (Tabela 16).

Tabela 16. Valores da actividade inicial e do tempo de meia-vida da nitrilase incubada com os estabilizadores e solvente orgânico seleccionados. Os valores de actividade inicial e do tempo de meia-vida estão expressos relativamente à amostra controlo sem aditivos, 16 U/mg<sub>proteína</sub> e 15h, respectivamente

16. a)

	Actividade inicial (%)		
	DMA (% v/v)		
	4	10	15
Sorbitol (1 M)	105	87	87
EG (1 M)	113	101	104

16. b)

	Tempo de meia-vida (%)		
	DMA (% v/v)		
	4	10	15
Sorbitol (1 M)	249	172	58
EG (1 M)	88	50	15

A estabilidade da enzima nitrilase é preferencialmente melhorada com 1M de sorbitol e 4% (v/v) de dimetilacetamida, aumentando o tempo de meia-vida 1,5 vezes. Estes resultados estão de acordo com os anteriores estudos isolados do efeito dos estabilizadores e dos solventes orgânicos.

### 3.4 - Resumo

A adição de polióis e açúcares nas soluções enzimáticas tiveram, de um modo geral, um efeito positivo na estabilização das respectivas actividades. Este resultado vai de encontro com o descrito na literatura, em que se encontra variados exemplos de estabilização de actividades enzimáticas com recurso à adição de estabilizadores em concentrações elevadas (10, 21, 27 e 28).

Tabela 17- Tempo de meia-vida relativamente aos controlos com a enzima correspondente sem aditivos

Enzima	Estabilizadores	Solventes Orgânicos	Estabilizador + Solvente Orgânico
Lipase	Sorbitol 1M	<b>586</b>	Sorbitol + DMA 1M 10% <b>256</b>
	Xilitol 1M	<b>554</b>	
	PEG 10% m/v	<b>517</b>	
Protease	Glicerol 1M	<b>648</b>	Glicerol + DMF 1M 4% <b>633</b>
	Sorbitol 1M	<b>159</b>	
	Xilitol 1M	<b>123</b>	
Nitrilase	Sorbitol 1M	<b>294</b>	Sorbitol + DMA 1M 4% <b>249</b>
	EG 1M	<b>166</b>	

Todos os polióis estudados têm um efeito positivo na estabilização da lipase. O tratamento enzimático do poliéster deve ser efectuado com sorbitol a elevadas concentrações, de modo a estabilizar a enzima, embora também seja melhorado com xilitol e polietilenoglicol. Este aditivo, polietilenoglicol, também melhora a estabilidade de outras enzimas como a catalase (10). Para abrir a estrutura da fibra de poliéster, danificando o menos possível a lipase, deve ser adicionado dimetilacetamida em pequenas concentrações.

A fibra de poliamida deve ser tratada com glicerol para aumentar a sua estabilidade. Este aditivo é também um bom estabilizador para outras enzimas como a catalase (10). Adicionando 1M de glicerol e 4% de dimetilformamida o tempo de meia-vida aumenta para 633% do valor sem aditivos.

A estabilidade da nitrilase é essencialmente melhorada com a adição de sorbitol. A adição de 4% (v/v) de dimetilacetamida diminui 10% o tempo de meia-vida. Esta perda de estabilidade pode ser compensada pela abertura da estrutura da acrílica, facilitando a acção da enzima. Adicionando 1M de sorbitol e 4% (v/v) de dimetilacetamida a estabilidade da nitrilase aumenta para 249% do valor controlo sem aditivos.

## 4 - Tratamentos Enzimáticos

O estudo da estabilização destas enzimas é de grande interesse para aplicação das mesmas ao tratamento de fibras têxteis sintéticas, de modo a modificar as suas propriedades. Para comprovar a vantagem do uso dos aditivos, foi feito o estudo das alterações das propriedades tintoriais da fibra acrílica quando tratada com enzima nitrilase e adicionando o estabilizador e solvente seleccionados.

### 4.1 - Perda de Peso

O tratamento enzimático tem o intuito de modificar a superfície da fibra. A hidrólise enzimática apenas quebra as ligações dos grupos nitrilo da fibra acrílica, pelo que a coesão das cadeias moleculares da fibra não será alterada. No entanto, para comprovar isto, foi feito o estudo do efeito do tratamento enzimático com e sem aditivos no peso da amostra. Após lavagem das amostras nas condições referidas no capítulo III (Materiais e Métodos), foram determinadas as perdas de peso relativas ao processo de lavagem e a cada um dos tratamentos enzimáticos. Fez-se um controlo, em que o tecido foi tratado nas mesmas condições, em solução tampão sem enzima nem aditivos.

Tabela 18. Valores percentuais das perdas de peso após os diferentes tratamentos

Tratamento	Perda de peso (%)
Controlo	0,3
Enzima	0,4
Enz. + Sorb. + DMA	0,9

Não houve perdas de peso significativas, relativamente à amostra controlo, cujo tratamento foi efectuado sem enzima. As perdas de peso foram inferiores a 1%. em todas as amostras. Os tratamentos enzimáticos podem então ser aplicados sem prejuízo da fibra acrílica.

## 4.2 - Tingimento

Como já foi referido anteriormente o estudo realizado com este trabalho tem como intuito final a sua aplicação nas fibras têxteis. Como tal, pretende-se comprovar a hidrólise da fibra sintética, e consequentemente o aumento da hidrofilidade que melhora a sua afinidade tintorial. A formação de grupos carboxílicos resultantes da hidrólise enzimática da fibra é traduzida pelo aumento do valor de K/S ao longo da zona do visível (28). Para comprovar a sua eficácia, os tecidos resultantes dos tratamentos efectuados no ensaio para determinação da perda de peso, foram tingidos com corante básico (figura 29).

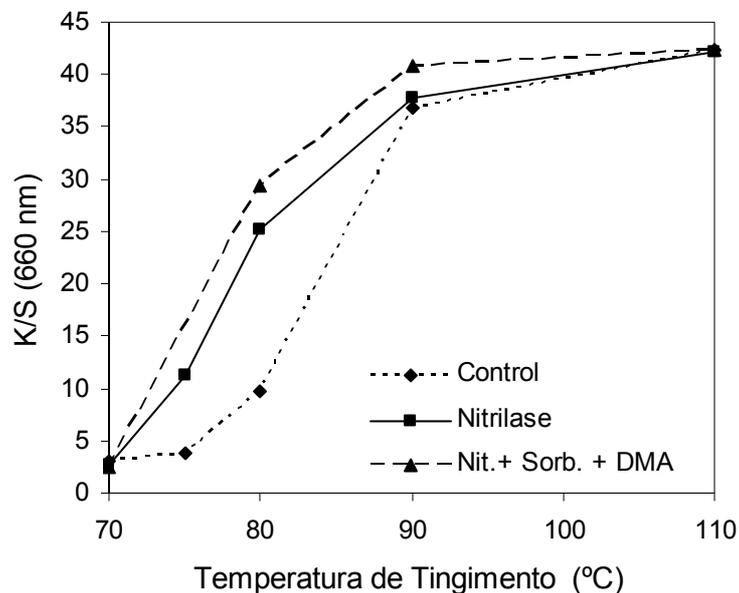


Figura 29 – Valores de K/S do tingimento das amostras com corante básico numa relação de banho de 1:100 (♦ amostra sem tratamento enzimático, ■ amostra tratada com 1 mg/ml de nitrilase, ▲ amostra tratada com 1 mg/ml de nitrilase, 1M de sorbitol e 4% de DMA).

Da figura anterior conclui-se que o tingimento da fibra tratada enzimaticamente pode ser efectuado a temperaturas inferiores à de transição vítrea da fibra acrílica (aproximadamente 90°C). A afinidade tintorial para este corante básico melhorou devido ao aumento de grupos carregados negativamente. Isto é uma evidência da formação de grupos carboxílicos resultantes da hidrólise dos grupos nitrilo da fibra acrílica. Com o tratamento enzimático, o valor de K/S a 75° e 80°C é quase triplicado, aumenta 190% e 160% respectivamente.

A adição de sorbitol e dimetilacetamida provoca um aumento da substantividade do corante, relativamente às amostras tratadas com enzima. A 80°C há um aumento de 17% no valor de K/S, relativamente à amostra tratada apenas com enzima. O aumento da substantividade deste corante foi também obtido por Tauber tratando fibra acrílica com uma enzima da família da nitrilase (nitrilo hidratase) e pequenas concentrações de solvente DMF (28).

### 4.3 - Resumo

O tratamento da fibra acrílica com a enzima nitrilase demonstrou ser eficaz, uma vez que foi comprovada a hidrólise da fibra, sem perda significativa de peso. O tingimento dos tecidos com corante básico foi demonstrativo da formação de ácidos carboxílicos, resultantes da hidrólise dos grupos nitrilo das fibras. O tingimento foi melhorado para as duas amostras diferentes, embora fosse mais notório para os tecidos tratados com a enzima nitrilase e com os aditivos seleccionados. O valor de K/S do tingimento da fibra com corante básico a 80°C aumentou para 257% nos tecidos tratados com enzima e 300% nos tratados com enzima e aditivos, relativamente ao valor para o tingimento dos tecidos não tratados com enzima.

## V - CONCLUSÕES

### *Lipase*

Todos os estabilizadores estudados provocaram um efeito positivo na estabilização da lipase. Os aditivos que aumentaram mais a estabilidade enzimática ao longo do tempo foram os polióis d-sorbitol (586% relativamente ao controlo) e xilitol (554%). A extensão do efeito aumenta com o número de carbonos do poliól. A adição de dimetilacetamida em concentrações menores que 4% (v/v) provoca uma perda do valor do tempo de meia-vida de apenas 4% do valor controlo.

Para uma maior estabilização, a melhor combinação obtida para a lipase com solvente e estabilizador foi 1M de sorbitol com 10% (v/v) de dimetilacetamida com um tempo de meia-vida 256% do valor controlo.

### *Protease*

Os aditivos que aumentam a estabilidade enzimática ao longo do tempo são o glicerol (648%), d-sorbitol (159%) e xilitol (123%). O solvente que provoca menor desnaturação da enzima é a dimetilformamida, que deve ser adicionada à preparação enzimática, para tratamento da fibra de poliamida, em concentrações menores a 4% (v/v), reduzindo o valor de tempo de meia-vida

para 90% do valor controlo. Espera-se que esta perda de estabilidade seja compensada pela penetração facilitada da enzima na estrutura da fibra, uma vez que esta sofre um desarranjo da sua estrutura.

A melhor conjugação da protease com solvente e estabilizador é 1 M de glicerol com 4% (v/v) de dimetilformamida. Com estes aditivos, a protease apresenta maior estabilidade, apresentando o valor do tempo de meia-vida de 633 % do obtido para a preparação enzimática sem aditivos.

### *Nitrilase*

Os aditivos que provocam maior aumento da estabilidade enzimática ao longo do tempo são o sorbitol e o etilenoglicol, melhorando o valor do tempo de meia-vida para 294% e 166%, respectivamente. O solvente dimetilacetamida pode ser adicionado até 4% (v/v) diminuindo apenas o tempo de meia-vida para 90% do valor controlo. Com os aditivos seleccionados o valor do tempo de meia-vida sofre um aumento para 249% do valor controlo.

Demonstrou-se que a enzima nitrilase actua na fibra acrílica hidrolisando os grupos nitrilo. A sua acção foi mais notória nos tecidos tratados com nitrilase e 1M de sorbitol e 4% (v/v) de dimetilacetamida. O aumento da substantividade do corante básico para os tecidos tratados foi demonstrativo da formação de ácidos carboxílicos, resultantes da hidrólise dos grupos nitrilo das fibras.

## VI – PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudo, integrado numa linha de investigação desenvolvida pelo departamento de Engenharia Têxtil, abre novas portas no que concerne ao estudo da aplicação destas enzimas para melhoramento das propriedades dos tecidos. Deste modo, devem ser feitas novas investigações na área de aplicação das enzimas estudadas nas fibras sintéticas:

- Tratar enzimaticamente as fibras sintéticas de poliéster e poliamida com as enzimas lipase e protease, respectivamente. Avaliação da acção enzimática através do tingimento das fibras.
- Estudar o efeito da variação das condições de tratamento enzimático, como a concentração de enzima, tempo de tratamento.
- Investigar o efeito dos estabilizadores e solventes no tratamento enzimático das fibras de poliéster e poliamida.
- Monitorizar a hidrólise enzimática através da determinação de produtos de reacção ao longo do tempo do tratamento enzimático.

- Devem ser testadas outras enzimas, que possam ter uma acção hidrolítica na fibra mais efectiva.

Devem ser efectuadas novas investigações no sentido de aplicar todo o estudo de estabilização feito neste trabalho. Que como ficou aqui demonstrado tem grandes potencialidades, devendo-se continuar o estudo nesta área. Este trabalho, não deve por isso ser encarado como uma obra acabada mas como o início de novas investigações.

## VII - BIBLIOGRAFIA

- 1- BATTISTEL, E., MORRA M., MARINETTI M., Enzymatic surface modification of acrylonitrile fibers, **Applied Surface Science** 177, 32-41 (2001).
- 2- BHANDARKAR, S. V., NEAU, S. H., Lipase-catalyzed enantioselective esterification of flurbiprofen with n-butanol, **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 3, no.3 (2000).
- 3- BRADFORD., M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the principle of Protein-Dye Binding, **Analytical Biochemistry** 72, 248-254 (1976).
- 4- BRITTON and ROBISON, **J. Chem. Soc.** , 458 (1931).
- 5- BUGG, T., *An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*, 1997, Blackwell Science Ltd
- 6- CAVACO-PAULO, A., Sebenta da disciplina “Química Têxtil Macromolecular”, Departamento de Eng. Têxtil, Guimarães, 2000
- 7- *Chemistry of the Textiles Industry*, Department of Textiles, UMIST, Blackie academic & professional
- 8- COOK, J. G., *Handbook of Textil Fibres – Man made fibres*, Merrow Technical Library, 1984

- 9- COSTA, S. A., TZANOV, T., CARNEIRO, F., CAVACO-PAULO, A., Recycling of textile bleaching effluents for dyeing using immobilized catalase, **Biotechnology Letters** 24, 173-176 (2002).
- 10- COSTA, S. A., TZANOV, T., CARNEIRO, F., CAVACO-PAULO, A., Studies of stabilization of native catalase using additives, **Enzyme and Microbial Technology** 30, 387-391(2002).
- 11- CREIGHTON, T. E., *Protein Structure, A Pratical Approach*, second edition, 1997, IRL PRESS
- 12- FERSHT, A., *Enzyme Structure and Mechanism*, 2<sup>nd</sup> ed, New York, W. R. Freeman and Company, 1984
- 13- GAMA, F., TEIXEIRA, J. e MOTA, M., Cellulose Morphology and Enzymatic Reactivity. A Modified Solute Exclusion Technique, **Biotechnology Bioengineering** 43, 381-387 (1994).
- 14- GOMES, J. R., *Estrutura e propriedades dos corantes*, Braga, 2001
- 15- GONÇALVES, M. L. S. S., *Métodos Instrumentais Para Análise de Soluções*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1983
- 16- GUILLEN, J., G., *Fibras Acrílicas*, Terrasa, 1987
- 17- GUILLEN, J., G., *Fibras de Poliamida*, Terrasa, 1987
- 18- GUILLEN, J., G., *Fibras de Poliéster*, Terrasa, 1987
- 19- GUILLEN, J., G., *Fibras Textiles*, Terrasa, 1987
- 20- KUBELKA, P, **Journal of the Optical Society America** 38(5), 448-457 (1948).
- 21- MICHIAKI, M., KOJI, K., KAZUO, k., Effects of polyols and organic solvents on thermostability of lipase, **J Chemical Technology Biotechnology** 70, 188-92 (1997).

- 22- NORUSIS, M. J., *SPSS for Windows, Professional Statistics, Release 6.0*, SPSS Inc., Chicago, Illinois, 1993
- 23- PACE, H. C., BRENNER, C., The nitrilase superfamily: classification, structure and function, **Genome Biology** 2(1) (2001).
- 24- PAIVA, A. L., BALCÃO, V. M., MALCATA, F. X., Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases, **Enzyme and Microbial Technology** 27, 187-204 (2000).
- 25- Price, N. C., Stevens, L.; *Fundamentals of Enzymology*, 3<sup>rd</sup> edition, Oxford University Press, 2000
- 26- RICARDO, C. P., TEIXEIRA A., *Enzimas*, Didáctica Editora, 1976
- 27- ROCHA, J. M. S., GIL M. H., GARCIA, F. A. P., Effects of additives on the activity of a covalently immobilised lipase in organic media, **Applied and Environmental Microbiology** 66 (4), 1634-1638 (1998).
- 28- TAUBER, M. M., CAVACO-PAULO, A., GUEBITZ, G. M. , Nitrile Hydratase and Amidase from *Rhodococcus rhodochrous* Hydrolyze Acrylic Fibers and Granular Polyacrylonitriles, **Applied and Environmental Microbiology** 66(4) 1634-1638 (2000).
- 29- ALMATAWAH, Q. A., COWAN, D. A., Thermostable nitrilase catalysed production of nicotinic acid from 3-cyanopyridine, **Enzyme and Microbial Technology** 25, 718-724 (1999).
- 30- TRCINSKA, M., *Preliminary characterization of immobilized lipase from Rhizopus Cohnii*, Poster from "Biotrans 2001" Congress
- 31- <http://bendik.kje.ntnu.no/biocatalysis.html>
- 32- <http://www.psrc.usm.edu/>