

**Artur Manuel Cavaco Paulo**

**Influência da Agitação Mecânica e da Composição  
Enzimática no Tratamento do Algodão com Celulases**

*Dissertação apresentada para obtenção do  
Grau de Doutor em Engenharia Têxtil*

**Escola de Engenharia  
Universidade do Minho  
1995**

*Às minhas filhas:  
Joana e Gabriela*

## AGRADECIMENTOS

Quero expressar, em primeiro lugar, o meu sincero agradecimento ao Professor Doutor Luís M. M. Guimarães de Almeida, pela disponibilidade, apoio e pela forma extremamente positiva como orientou esta tese.

Ao CITEVE, na pessoa do seu Director Técnico, por ter permitido a realização da parte experimental deste trabalho nos seus laboratórios. Ao pessoal técnico do CITEVE, pela constante assistência no laboratório.

Ao Doutor David Bishop, da Universidade De Montfort, Leicester, UK por todas as discussões e sugestões acerca deste trabalho. Ao Conselho de Reitores das Universidades Portuguesas e British Council pelo financiamento das acções integradas, ao abrigo do Tratado de Windsor, que permitiram o contacto com o Doutor David Bishop.

Ao Matti Siika-Aho, do VTT Biotechnology and Food Research, Finlândia, por ter purificado a EG I e a CBH I da *Trichoderma reesei*. Às Doutoradas Liisa Viikari, Hanna-Leena Livio, Maija Tenkanen e, em especial, à Doutora Johanna Buchert pelas inúmeras discussões tidas.

À Eng. Minna Elovainio, da Primalco (ex-Alko), Finlândia, pelo fornecimento das misturas celulolíticas brutas da *Trichoderma reesei* e seus mutantes. Ao Doutor Thomas Videbeak, da Novo Nordisk, Dinamarca, pelo fornecimento da celulase de desenvolvimento SP492-PPC3617 e pelas amostras dos seus produtos comerciais Cellusoft L e Denimax T.

À Eng. Gabriela Canossa, da empresa Lameirinho, pelo fornecimento das amostras de flanela usadas neste trabalho.

À Dra. Fátima Machado, do Laboratório de Microscopia Electrónica da Universidade do Minho, e ao Sr. Azevedo, do Departamento de Ciências da Terra da Universidade do Minho (Difracção de Raios X), pela assistência técnica.

Ao Doutor Chris Carr pelas facilidades concedidas na UMIST, UK, na realização do vídeo de Microscopia de Electrónica de Alta Pressão.

Ao Dr. Miguel Gama, do Departamento de Engenharia Biológica, pelas estimulantes discussões tidas.

Ao Doutor Lubos Hes, do Departamento de Engenharia Têxtil, pela ajuda prestada na interpretação dos resultados das propriedades térmicas dos tecidos.

À Fundação Gulbenkian, Fundação Luso-Americana, British Council e Universidade do Minho pelo apoio financeiro prestado.

Ao Departamento de Engenharia Têxtil da Universidade do Minho pela dispensa de serviço docente concedida nos últimos dois anos.

À Teresa e à Raquel pela leitura e sugestões sobre o texto desta tese.

À Zé pela paciência, encorajamento e por sempre ter acreditado.

Braga, Julho de 1995

## RESUMO

O tratamento com celulases tem-se vindo a afirmar, nos últimos anos, como uma forma ecológica de processar o algodão. As duas aplicações mais frequentes são a obtenção do aspecto usado em artigos Denim e a remoção de borbotos e fibras soltas em tecidos de algodão. Estes efeitos de acabamento são geralmente obtidos com misturas celulolíticas brutas e em processos com forte agitação mecânica.

No presente trabalho estudou-se a acção de várias celulases sobre o algodão em diferentes níveis de agitação mecânica durante os tratamentos, com o objectivo de investigar a cooperação entre a acção celulolítica e a fricção mecânica durante o processamento do algodão. As propriedades dos tecidos tratados foram avaliadas e relacionadas com a actividade celulolítica e com o nível de agitação mecânica utilizados durante os ensaios enzimáticos. A actividade das várias misturas celulolíticas usadas foi medida no algodão, em celulose Avicel inchada com ácido fosfórico, em carboximetilcelulose e em celobiose.

A actividade de duas composições celulolíticas, correntemente usadas no processamento do algodão, foi comparada. A celulase, que é recomendada na remoção de borbotos e fibras soltas, mostrou ter uma actividade superior à que é recomendada para processos de envelhecimento do algodão, tendo esta última composição celulolítica maior actividade relativa em carboximetilcelulose (maior actividade relativa "endo"). Os parâmetros mecânicos dos tecidos tratados com estas celulases que mais se correlacionaram com a perda de peso foram a espessura (flanelas) e os de flexão (flanelas e popelines). A celulase mais activa mostrou diminuir os valores dos parâmetros de flexão, enquanto a celulase com maior actividade relativa "endo" aumentou estes valores.

O pré-tratamento de tecidos com uma endoglucanase não influenciou a extensibilidade de tratamentos posteriores com um complexo celulolítico. A endoglucanase usada, apesar de não ter mostrado actividade no algodão, provocou perda de peso nos tecidos, em processos com forte agitação mecânica. Esta perda de peso foi o resultado da remoção de material fibrilar, observando-se à superfície das fibras, pontas de fibrilas soltas, com conseqüente aumento da fricção interfibras e da histerese à flexão. O posterior tratamento com um complexo celulolítico removeu as pontas soltas, diminuindo a histerese à flexão e melhorando a aparência do tecido.

Comparou-se a acção no algodão, da mistura celulolítica bruta originária da *Trichoderma reesei* com misturas onde se apagou a actividade de EG I e EG II ou de CBH I e CBH II. A falta das EGs ou das CBHs na mistura celulolítica levou ao aumento relativo das actividades em Avicel Inchada e carboximetilcelulose, respectivamente, quando comparadas com a mistura bruta. A perda de resistência é devida à actividade em endoglucanase, pois verificou-se que a mistura rica em EGs teve sempre a maior razão entre a perda de resistência e a perda de peso. A acção mecânica aumenta a actividade em EGs relativamente à actividade em CBHs, pelo que se verificou que os processos sem qualquer acção mecânica têm a menor razão entre a perda de resistência e a perda de peso.

A cooperação entre a acção mecânica, durante os tratamentos, e a actividade celulolítica foi investigada por estudos cinéticos e de adsorção. Os dois níveis de acção mecânica considerados diferem entre si pela presença de discos de aço (usados nos testes de solidez à lavagem) nos copos de tratamento. Nos processos com maior acção mecânica, a adsorção da enzima ao algodão é reduzida por fricção e batimento no tecido, que simultaneamente criam um maior numero de "sítios" livres onde a enzima pode actuar. Isto verifica-se especialmente para a enzima rica em EGs.

A acção da EG I, da CBH I (*T. reesei*) e das suas misturas no algodão, foi também investigada. Verificou-se que a EG I é mais activa que a CBH I e que a composição, na qual o sinergismo é máximo, corresponde a 60-80 % de CBH I e 40-20 % de EG I. Estes ensaios realizados com os componentes purificados e suas misturas confirmaram as observações feitas acerca do efeito das actividades EG e CBH no algodão.

## ABSTRACT

*(The Role of Mechanical Agitation and Enzymatic Composition on the Treatment of Cotton with Cellulases)*

The cellulase treatment is an ecological way of finishing cotton textiles. Applications like the reduction of pilling, softening and ageing (like the fashionable stone washed aspect of denims) are widely used in textile processing. These finishing effects are generally obtained with unoptimized crude cellulases and with processes with strong mechanical agitation.

The aim of this work is to study the cooperation between cellulolytic and mechanical actions during cotton processing. For this, the effect of several cellulases in cotton was investigated in processes with different levels of mechanical agitation. The properties of the treated fabrics were evaluated and related with the process conditions of the treatment. The cellulolytic compositions used in this work were characterized towards cotton, swollen Avicel (with Phosphoric Acid), carboxymethylcellulose and cellobiose.

The activity of two commercial cellulases was compared. The cellulase used in pilling reduction processes shows a higher activity than the cellulase used in ageing processes. The ageing cellulase shows, however, a relative higher "endo" activity, due to its higher activity on carboxymethylcellulose. The most important parameters that can be correlated with weight loss are the bending parameters (poptins and flannelettes) and thickness (flannelettes). The most active cellulase usually decreases bending parameters, while the ageing cellulase increases it.

The pretreatment with endoglucanase did not have a major influence on the course of subsequent treatments by a cellulolytic mixture. The endoglucanase used didn't show any activity as reducing sugars in cotton, but it produced cotton weight loss in a process with high level of mechanical agitation. The weight loss is a result of the removal of fibrillar material, with raising of fibrils at fibre surface, with an increase of inter-fibre friction and bending hysteresis. The subsequent treatment with a cellulolytic mixture will remove the raised fibrils with a decrease of bending hysteresis and improving fabric appearance.

The enzymatic hydrolysis of cotton fibres was studied using a total crude cellulase from *Trichoderma reesei*, and two engineered cellulases from which the activities of either the major endoglucanases (EG I and EG II) or the major cellobiohydrolases (CBH I and CBH II) had been deleted. The deletion of major EGs or major CBHs in the original crude mixture results in an increase of activity towards swollen Avicel or carboxymethylcellulose, respectively. The loss of resistance of fabric is due to endoglucanase activity, as the treatment with EGs rich mixtures led to highest ratio of breaking load loss over weight loss. Mechanical agitation increases EG activity relatively to CBH activity, being verified, that processes without any agitation have the smaller ratio of breaking load loss over weight loss.

The cooperation between mechanical agitation and cellulolytic activity was studied by kinetic and adsorption studies. The two levels of mechanical agitation are different because of the steels discs added, that are used in various fastness tests. Increasing mechanical action will decrease enzyme adsorption, increasing the number of free "sites" where enzyme can attack. This is verified with a higher extent for the crude rich on EG activity.

A confirmation was made with CBH I and EG I (*T. reesei*) of major observations done by EG and CBH activities on cotton. It was verified that EG I is the most active enzyme on cotton and that the higher synergism between both enzymes is verified in a composition made of 60-80% of CBH I (40-20 % of EG I).

## ÍNDICE

Agradecimentos	2
Resumo	3
Abstract	4
Índice	5
I - INTRODUÇÃO	6
II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
1- Algodão	7
2- Celulases	10
3- Modelos Cinéticos e de Adsorção Relativos ao Processo de Hidrólise Enzimática do Algodão	15
4- Processamento do Algodão com Celulases	17
5- Alterações Mensuráveis no Substrato após o Tratamento Enzimático	19
6- Considerações Finais e Objectivos da Tese	21
III - MATERIAIS E METODOLOGIAS	22
1- Materiais	22
2- Metodologias	23
IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
1- Actividade Enzimática	30
2- Efeito da Concentração da Enzima	30
3- Análise Multivariada dos Parâmetros dos Tecidos Tratados com Celulases	36
4- Efeito do Pré-Tratamento com Endoglucanase (SP492-PPC3617) na Hidrólise na Popelina ne Algodão com cm Complexo Celulolítico	44
5- Tratamentos Longos e Curtos com Crudes de <i>Trichoderma reesei</i>	54
6- Parâmetros Cinéticos e de Adsorção Relativos à Hidrólise do Algodão com Crudes de <i>Trichoderma reesei</i>	57
7- Tratamento do Algodão com Misturas de Crudes de <i>Trichoderma reesei</i>	59
8- A Acção de EG I e CBH I, da <i>Trichoderma reesei</i> , no Algodão	62
9- Tratamento do Algodão com Composições de EG I e CBH I de <i>Trichoderma reesei</i>	63
V - DISCUSSÃO GERAL	67
1- Caracterização das Celulases Usadas	67
2- Estudos Cinéticos e de Adsorção	68
3- A Acção Mecânica nos Processos de Hidrólise com Celulases	68
4- Substratos Tratados	69
5- Conclusões	70
VI - PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

## I - INTRODUÇÃO

A hidrólise enzimática de materiais celulósicos por celulases tornou-se num dos campos de investigação mais interessantes do ponto de vista energético e de produção de matéria prima bruta, particularmente depois da segunda crise do petróleo. Este processo apresenta vantagens relativamente à hidrólise ácida, pois trata-se de uma reacção específica que se processa em condições de temperatura e pressão moderadas, não produzindo produtos secundários. Verificou-se no entanto que, devido à estrutura cristalina dos substratos celulósicos, o processo enzimático era muito lento e que o grau de degradação destes materiais era baixo (1). Na última década, estes dados vieram proporcionar um interesse crescente no uso da hidrólise enzimática no processamento têxtil. Com efeito, o facto de o algodão ser uma das formas de celulose mais cristalinas que se conhece, permite um tratamento controlado com celulases, melhorando as suas propriedades, sem grande degradação da fibra (2, 3).

O tratamento do algodão com celulases permite obter tecidos com um tacto mais agradável, possibilitando também a redução do "pilling" por remoção de fibras soltas (2, 3). A aplicação mais comum é, no entanto, a obtenção do aspecto usado ou envelhecido de artigos Denim pelo tratamento com celulases, em substituição do processo *Stone-Wash* com pedra-pomes, minimizando-se assim a degradação dos tecidos e da maquinaria (4).

As celulases têm tido também uma aplicação crescente na formulação dos pós de lavagem domésticos, por aumentarem o seu poder detergente (5) e também por limparem a superfície das fibras de fibrilas soltas e de partículas de sujidade presas (6). Isto vai conferir ao artigo de algodão lavado um tacto mais macio e um melhor aspecto, com cores mais vivas (6). O tratamento com celulases também é usado no amaciamento de fibras lenho-celulósicas, como o linho, o cânhamo e a juta, facilitando o seu processamento industrial (7).

O acabamento com celulases, no processamento têxtil, tem a vantagem de ser um tratamento permanente, ao contrário dos outros, em que o produto de acabamento pode ser removido pelo posterior uso e lavagem (2). Uma vantagem adicional é o facto das celulases serem produtos naturais, enquanto que os outros produtos usados em acabamentos químicos são sintéticos e, na sua maioria, nocivos para o meio ambiente (2).

As celulases são misturas de três tipos de enzimas: as *endoglucanases*, que "partem" aleatoriamente as cadeias de celulose, as *exoglucanases*, que "partem" a celobiose ou a glicose das extremidades do polímero e a *celobiase* que "parte" a celobiose em glicose (8). Estes componentes celulolíticos actuam entre si sinergicamente, desconhecendo-se em detalhe os seus mecanismos de acção (8).

O processamento dos tecidos de algodão com celulases é feito em barcas, *jets* ou tambores rotativos de lavar (2). Este tipo de maquinaria fornece uma agitação mecânica vigorosa essencial aos acabamentos conferidos pelas celulases (2). No entanto, pouco se sabe acerca da influência da acção mecânica no tratamento enzimático dos tecidos.

No presente trabalho estudou-se a acção de várias composições celulolíticas sobre o algodão em diferentes níveis de agitação mecânica durante os tratamentos, com o objectivo de investigar a cooperação entre a acção celulolítica e a fricção mecânica durante o processamento do algodão. As propriedades dos tecidos tratados foram avaliadas e relacionadas com a actividade celulolítica e com o nível de agitação mecânica utilizados durante os ensaios enzimáticos.

## II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica aqui apresentada vai incidir sobre os aspectos mais fundamentais do algodão e das celulases (substrato e enzima, respectivamente) bem como na discussão acerca dos modelos cinéticos e de adsorção correntemente usados. Evidenciam-se também os aspectos práticos relativos ao processamento com celulases e as alterações mensuráveis no substrato após os tratamentos enzimáticos.

### 1- ALGODÃO

O algodão é uma fibra natural de origem vegetal. As suas fibras derivam da semente da planta do género *Gossypium*. Existem diferentes variedades de algodão, que dependem da sua origem geográfica e do seu grau de maturidade (9, 10).

#### 1.1- Estrutura Morfológica do Algodão

As fibras de algodão têm uma estrutura multifibrilar ao longo do comprimento, apresentando diversas camadas consecutivas (fig. II.1) cujo corte transversal se assemelha à forma de um "feijão" (10, 11).

A cutícula é uma parede fina exterior, não celulósica, constituída por ceras, gorduras, proteínas e pectinas (10).

A parede primária é constituída por celulose (> 50%), contendo também proteínas, pectinas e ceras (11). Um exame ao microscópio electrónico mostra que as fibrilas exteriores desta camada são paralelas ao eixo da fibra e formam, com as interiores, uma rede aproximadamente ortogonal (10).

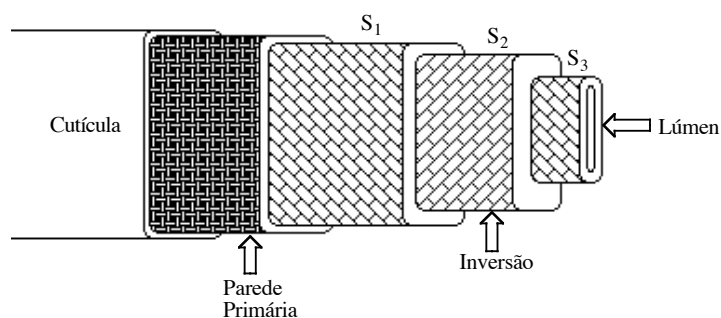


Figura II.1- Estrutura morfológica esquemática da fibra de algodão (11).

A parede secundária, essencialmente celulósica, é a mais espessa e cristalina de todas e é composta pela camada S<sub>1</sub>, exterior e pela S<sub>2</sub>, interior. Em S<sub>1</sub> os feixes de fibrilas estão dispostos helicoidalmente em redor de fibra, formando com o seu eixo um ângulo de 20-35° (10). A camada S<sub>2</sub> constitui cerca de 95% do peso da fibra. A secção transversal duma fibra de algodão inchada com soda cáustica mostra uma série de anéis concêntricos, devido ao aumento de volume de S<sub>2</sub>. O número destes anéis pode ser correlacionado com o número de dias de crescimento da fibra de algodão. Tal como em S<sub>1</sub>, em S<sub>2</sub> os feixes de fibrilas estão dispostos helicoidalmente em redor do eixo da fibra, mas formando com este um ângulo de 20-30° (11). Em S<sub>2</sub> observa-se ainda que os feixes de fibrilas têm inversões no sentido do enrolamento.

A parede terciária, S<sub>3</sub>, ou parede do lúmen, praticamente só se observa em fibras de algodão muito maduras. Nesta camada a disposição do feixe de fibrilas é similar a S<sub>1</sub>, sendo assim distinto da camada S<sub>2</sub> (11).

O lúmen, que constitui a parte mais interior das fibras de algodão, é composto por ceras, pectina e restos de protoplasma (10).

#### 1.2- Composição do Algodão

O algodão bruto tem na sua composição, para além de celulose em excesso, os componentes comuns das células vegetais (9). Estes componentes são gorduras, ceras, óleos, pectoses, pectinas, proteínas e compostos relativos azotados, ácidos orgânicos e material corante natural. Os fios e tecidos de



algodão podem ter, adicionalmente, sujidade, encolantes e óleos de máquinas, resultantes dos processos de fabrico. A composição seca do algodão bruto (9) é a seguinte:

- 93.0% de celulose
- 0.5% de óleos, ceras e gorduras
- 5.5% de proteínas, pectoses e matéria corante
- 1.0% de minerais

O teor de água no algodão é de 7 - 10% a 20°C e a 65 % de humidade relativa. Quando as fibras de algodão bruto são tratadas com soluções alcalinas diluídas, em ebulição, todo o material não celulósico é removido, obtendo-se fibras com um conteúdo seco superior a 99% de celulose. A este tratamento dá-se o nome de fervura alcalina (10).

### 1.3- Celulose do Algodão

A celulose, ao nível molecular (fig. II.2), é um polímero de unidades moleculares de β-D-glicose, ligadas entre si por ligações glicosídicas 1,4 β-D (10-11-12).

Da hidrólise da celulose obtêm-se polímeros mais pequenos, oligossacáridos com terminais redutores e não redutores (fig. II.2) que, após hidrólises mais extensas decompõem-se dando origem a celobiose (dissacárido) e a glicose (9, 10).

O número de grupos terminais redutores (fig. II.3) é determinado a partir do número de cobre. Este valor é obtido pela quantificação do óxido de cobre (I), produto da reacção da solução de Fehling (solução alcalina de Cu (II)) com a amostra celulósica (9). A quantificação do óxido cuproso produzido é feita indirectamente, envolvendo a reoxidação a Cu (II) com sulfato de ferro (III) em meio ácido, e posterior determinação do Fe (II) por titulação com permanganato. Esta metodologia data dos anos 20 (9), propondo-se na parte experimental deste trabalho um novo método directo, mais rápido e preciso, de determinação dos grupos terminais redutores. Este novo método baseia-se no facto do quelato de neocuproína Cu (II) adquirir cor alaranjada, após ser reduzido a neocuproína Cu (I) em meio alcalino. O complexo solúvel de Cu (I) fica então em solução podendo determinar-se a sua concentração por leitura da densidade óptica, a 475 nm (13).

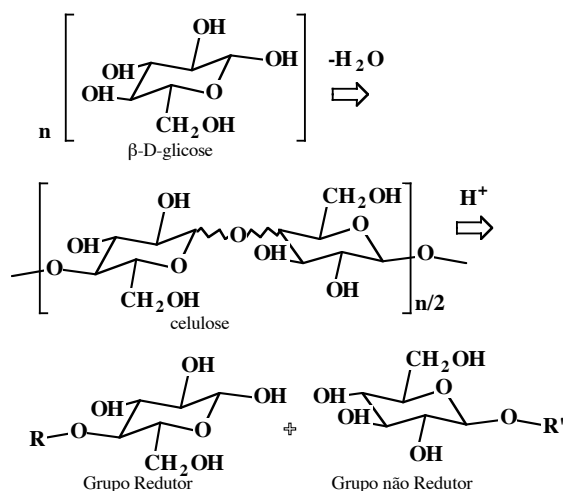


Figura II.2- Reacções de formação e de hidrólise da celulose. R e R' são as semi-cadeias do polímero de celulose. A ligação em zig-zag representa a ligação glicosídica 1,4 β-D.

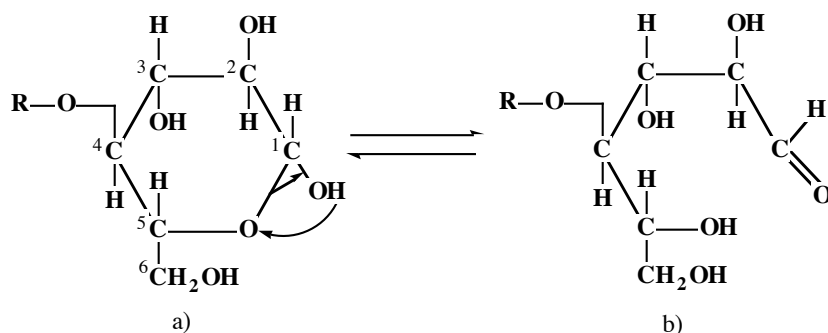


Figura II.3- Representação do hemiacetal (a) e do aldeído (b) do grupo terminal redutor. R é a semi-cadeia do polímero de celulose.

No entanto, se as amostras celulósicas forem previamente submetidas a uma fervura alcalina e branqueadas com peróxido de hidrogénio ou hipoclorito de sódio, formam-se outros grupos redutores, com eventual rompimento do anel glicosídico, reduzindo estes também o Cu (II) (14, 15).

#### 1.4- Acessibilidade na Celulose do Algodão

Estudos sobre metilações sucessivas da celulose do algodão indicam que a acessibilidade dos grupos hidroxilo da celulose é maior à superfície das fibras, onde existe um máximo de 44% de unidades glicosídicas disponíveis, considerando ainda que existe alguma penetração dos reagentes durante os tratamentos (16). Os grupos hidroxilo disponíveis para estas metilações são os correspondentes aos do carbono 2 (OH-2), 3 (OH-3) e 6 (OH-6) (fig. II.4). A sequência decrescente da acessibilidade destes grupos hidroxilo é a seguinte: (OH-2) > (OH-6) > (OH-3) (17), o que significa que estes grupos estão ocupados na sequência inversa das ligações de hidrogénio necessárias para manter a coesão da celulose. Acredita-se que (12), nas regiões mais ordenadas da celulose, todos os grupos hidroxilo do carbono 3 (C-3) estejam ocupados em ligações de hidrogénio com o oxigénio do anel relativo ao C-5, tal como com os oxigénios dos C-2 e C-6, embora neste último caso com menor intensidade devido às maiores distâncias entre estes dois oxigénios (fig. II.4).

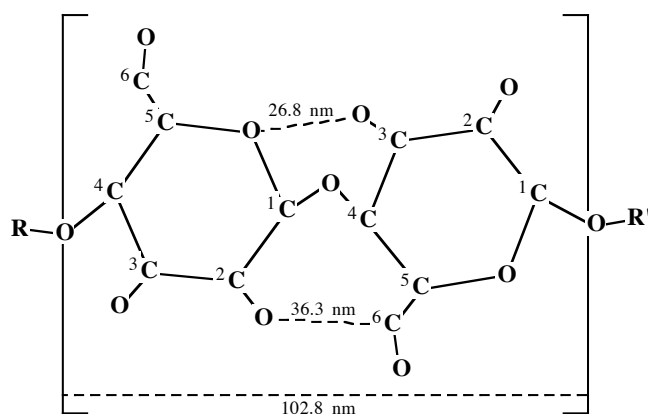


Figura II.4- Representação do modelo das interações de hidrogénio entre as unidades celulósicas (12) [perpendicular aos anéis celulósicos]. R e R' são as semi-cadeias do polímero de celulose.

A acessibilidade dos grupos hidroxilo menos "disponíveis", em zonas mais ordenadas, é de 13 e 14% para os OH-3 e OH-6, respectivamente, passando para 88 e 56 % em zonas de menor ordenação (17). Rowland (17), apresentou um modelo da fibrila elementar para o algodão (fig. II.5), para tentar explicar estas medidas de acessibilidade.

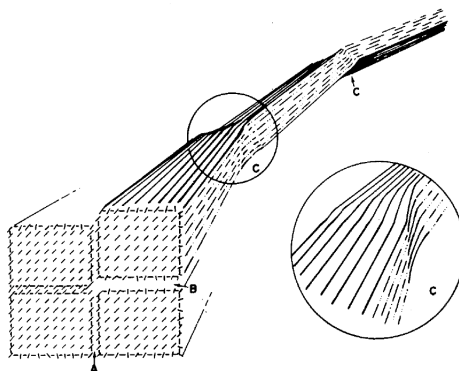


Figura II.5- Representação esquemática do modelo de Rowland (17) para a fibrila elementar do algodão, mostrando: A- superfícies coalescentes juntas e altamente ordenadas, B- superfícies levemente desordenadas e de acessibilidade fácil e C- zonas de torção facilmente acessíveis.

#### 1.5- Inchamento do Algodão

O inchamento do algodão pode fazer-se ao nível das zonas menos ordenadas, entre as "cristalites", sem alteração da estrutura cristalográfica da celulose, chamando-se assim inchamento intercristalino (18). Solventes orgânicos como a formamida, o etilenoglicol e o iso-octano são usados como agentes de inchamento intercristalino, embora a água seja o mais comum. Quando o agente de inchamento penetra nas "cristalites", designa-se por intracristalino (19). Soluções alcalinas concentradas de hidróxidos

metálicos ou de sais inorgânicos são os agentes de inchamento intracristalino mais comuns, modificando a estrutura cristalina da celulose nativa para outras formas (12, 20).

A mercerização do algodão é uma das mais importantes aplicações industriais do inchamento intracristalino. Este tratamento transforma a celulose I, ou nativa, numa mistura de celulose I, celulose II e celulose amorfa (20) (tab. II.1 e fig. II.6).

Celulose	a (Å)	b(Å)	c(Å)	$\beta$ (graus)
I	8.35	10.3	7.9	84°
II	8.14	10.3	9.14	62°

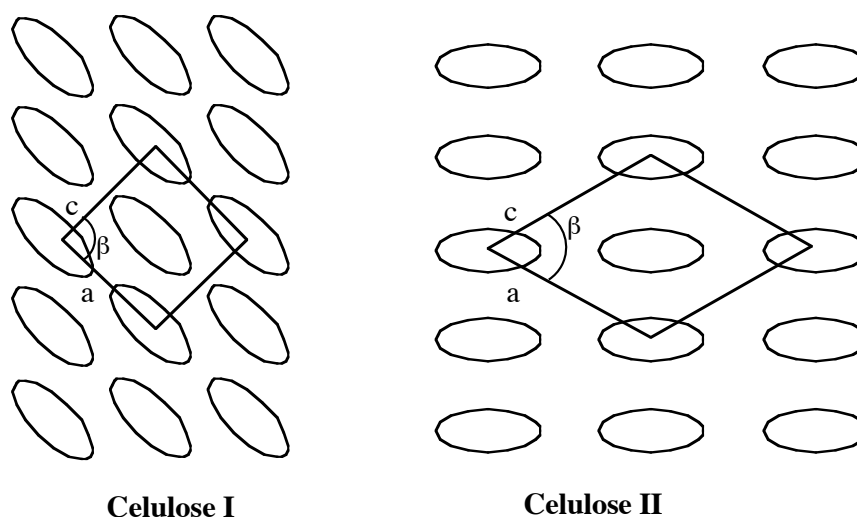


Figura II.6- Planos cristalinos ac da celulose I e da celulose II, perpendiculares ao eixo da fibra (20).

A mercerização consiste num tratamento do algodão, sob tensão, com uma solução de NaOH de 300 g/l. Observa-se que, após o tratamento, o algodão aumenta a sua resistência à tracção e a sua afinidade aos corantes. A aparência microscópica da fibra de algodão é também alterada (9): devido ao inchamento provocado pelas soluções de NaOH concentradas, a forma achatada longitudinal passa a uma forma cilíndrica e, conseqüentemente, em corte transversal, a fibra deixa de ter a forma de "feijão" para apresentar uma forma mais circular.

## 2- CELULASES

As celulasas são enzimas que catalizam a hidrólise da celulose. Tal como outros tipos de enzimas possuem uma estrutura tridimensional proteica, sendo constituídas por aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas. Estão presentes em vários sistemas vivos e, quando degradadas, podem ser rapidamente absorvidas na natureza (21).

As celulasas são produzidas por microrganismos, como bactérias ou fungos, plantas superiores e alguns animais invertebrados (22). Os animais vertebrados, como os répteis ou os ruminantes, não produzem celulasas, dependendo dos microrganismos existentes no seu tubo digestivo para a degradação dos materiais celulósicos ingeridos (23, 24).

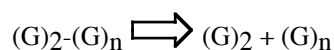
As celulasas mais intensivamente estudadas são as produzidas por fungos (22). O maior interesse nos sistemas celulolíticos fúngicos reside no facto de estes serem extracelulares e, por isso, de mais fácil obtenção (25). Os microrganismos mais utilizados na produção industrial de celulasas são todos de origem fúngica, como *Aspergillus niger*, *Humicola insolens*, *Penicillium funiculosum* e *Trichoderma reesei* (26).

As celulasas comerciais usadas neste trabalho são originárias de *Humicola insolens* e *Trichoderma reesei*, sendo estes os fungos produtores da maioria das celulasas usadas no processamento têxtil. Por estas razões, a revisão bibliográfica desta tese irá incidir, essencialmente, nestes sistemas celulolíticos.

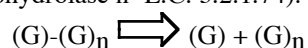
### 2.1- Classificação das Celulasas

A hidrólise da celulose é feita por uma mistura de enzimas, conhecidas e referenciadas na literatura como celulasas. Existem quatro tipos de celulasas (22, 27, 28) que são definidos como (G - é uma unidade glicosídica):

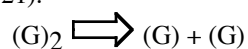
A- Celobiohidrolase (CBH), que "parte" a celobiose do ramo da macromolécula com o grupo final não redutor (exo-1-4- $\beta$ -D-Glucan-cellobiohydrolase n° E.C: 3.2.1.91).



**B- Exoglucanase**, que "parte" a glicose com o grupo final não redutor (exo-1-4-β-D-Glucohydrolase nº E.C: 3.2.1.74).



**C- Celobiase**, que hidrolisa a celobiose a glicose. (β-D-Glucoside glucanohydrolase nº E.C: 3.2.1.21).



**D- Endoglucanase (EG)**, que "parte" aleatoriamente longos polímeros em polímeros mais pequenos (endo-1-4-β-D-glucanohydrolase nº E.C: 3.2.1.4 ).



A exoglucanase (E.C: 3.2.1.74) não é referenciada na maior parte da literatura, porque existe em muito poucos sistemas celulolíticos e porque não interage sinergicamente com as outras celulasas (**25, 29**).

## 2.2- Actividade das Celulasas

A caracterização da actividade das celulasas apresenta algumas particularidades que não se encontram noutros tipos de enzimas (**30**). O facto dos sistemas celulolíticos serem um complexo multicomponente de EGs, CBHs e celobiasas, que actuam sinergicamente, dificulta o entendimento detalhado da degradação enzimática (**8, 30**). As celulasas são pouco específicas, estando essencialmente relacionadas com a hidrólise de ligações glicosídicas 1-4 β-D, presentes em substratos bastante diversos estrutural e quimicamente (**8**).

Os substratos das celulasas podem ser vários, desde as celulosas cristalinas e amorfas, aos derivados solúveis e quimicamente diferentes como a carboximetilcelulose (CMC) ou a hidroxietilcelulose (HEC) (**8, 22, 28, 30**). As celulosas mais frequentemente usadas na medição das actividades enzimáticas são a celulose do papel de filtro (Whatman nº1), a celulose do algodão fervido ou a celulose microcristalina Avicel (**8, 22, 29, 30**). No entanto, a degradação da celulose cristalina é bastante lenta, pelo que se recorreram a outras formas de celulose mais amorfas e mais susceptíveis de serem hidrolisadas. Uma das celulosas mais usadas é preparada por degradação parcial e inchamento com ácido fosfórico (**8, 22, 29, 30**) por tratamento das celulosas cristalinas.

A actividade sobre celulose é medida como açúcares redutores solúveis e é entendida como resultado da acção total de todo o complexo celulolítico (**8, 22, 29, 30**). A actividade medida sobre os derivados da celulose, CMC ou HEC, como açúcares redutores ou variação de viscosidade, é empiricamente entendida como a actividade em endoglucanase (**8, 22, 29, 30**). A presença de grupos laterais parece impedir a acção das exo-glucanases. Por fim, a actividade medida em celobiose quantifica a acção da celobiase presente (**30**).

Não existem métodos padrão para medir as actividades das celulasas, já que os princípios indicados são generalistas e não particulares (**8, 29**). Existem, no entanto, recomendações específicas da IUPAC (**30**) para a medição das actividades celulolíticas sobre os seguintes substratos: papel de filtro, CMC (HEC) e a celobiose, embora estas recomendações não sejam seguidas pela maioria dos investigadores (**8, 29**).

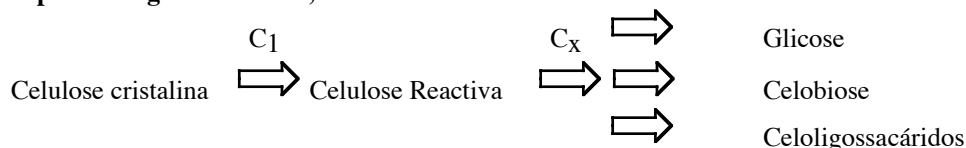
A caracterização de componentes celulolíticos altamente purificados mostrou que estes não têm exclusivamente actividades tipicamente endo ou exo, mas uma mistura destes dois tipos de actividade (**8, 29**). Existem casos particulares de CBHs com actividade em CMC e de EGs capazes de produzirem grandes quantidades de açúcares solúveis (**8, 29**).

No entanto, para a caracterização de misturas celulolíticas, a análise comparativa dos valores das actividades sobre os substratos clássicos aqui referidos, continua a ser a única maneira de caracterizar a "possível" composição enzimática, apesar de muito do mecanismo de acção das celulasas permanecer ainda por esclarecer.

## 2.3- Mecanismos Clássicos de Acção das Celulasas

O primeiro mecanismo de acção das celulasas (fig. II.7) foi proposto em 1950 por Reese (**29**). Este modelo já aceitava o facto de a celulase ser um sistema multicomponente de enzimas. A celulose era inicialmente atacada por um componente C<sub>1</sub>, não hidrolítico e capaz de desagregar as cadeias do polímero. A celulose ficaria assim reactiva para os componentes C<sub>x</sub>, os quais eram uma série de β-1-4 glucanases não actuantes na celulose cristalina, mas capazes de degradar a celulose (reactiva) a celoligossacáridos, a celobiose e a glicose. Este conceito foi aceite durante muito tempo, até ao isolamento duma CBH que tinha propriedades do hipotético componente C<sub>1</sub> (**29**). Em 1975, Reese (**29**), não convencido que a CBH fosse o componente C<sub>1</sub>, modificou a sua hipótese (fig. II.7) sugerindo que C<sub>1</sub> fosse uma EG que actuava aleatoriamente, capaz de hidrolisar algumas ligações covalentes, não sendo esta actividade detectável hidroliticamente. Nesta nova hipótese, a CBH era relegada para o papel de uma das enzimas C<sub>x</sub>.

**Hipótese original de Reese, 1950**



**Hipótese modificada de Reese, 1975**

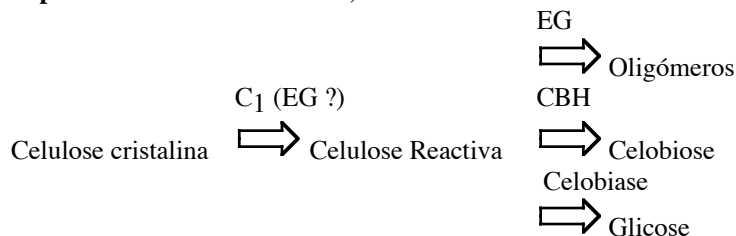


Figura II.7 - Hipóteses original e modificada para o mecanismo de acção das celulasas envolvendo o componente C<sub>1</sub>.

Um dos aspectos mais controversos, nos modelos de Reese, era saber qual a enzima que iniciava o ataque à celulose cristalina e, portanto, desempenhava o papel de C<sub>1</sub>. Apesar de não haver evidência da existência de C<sub>1</sub>, foi atribuído o seu papel a factores não enzimáticos capazes de gerar fibras curtas e microfibrilas da celulose (30). Outros trabalhos sugerem que C<sub>1</sub> poderia ser a celobiose oxidase ou a glicose oxidase (29) que são enzimas não hidrolíticas.

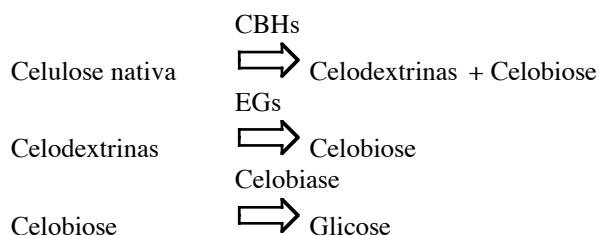


Figura II.8- Hipótese de Enari, 1987

Devido à refinação das técnicas de purificação de enzimas, da identificação dos seus genes e da expressão destes noutros sistemas, tornou-se possível a obtenção das enzimas purificadas. O sistema da *Trichoderma reesei* foi um dos mais estudados tendo sido possível a obtenção de CBHs, EGs e celobiase (8). Trabalhos com estas enzimas levaram Enari *et al* (8), em 1987, a propor que o ataque inicial era conduzido pelas CBHs, formando-se celodextrinas e celobiose (fig. II.8). As celodextrinas eram por sua vez hidrolisadas por EGs e a celobiose pela celobiase (8).

TABELA II.2- Actividade dos Componentes da <i>Trichoderma koningi</i> no Algodão (29)	
Enzima	Solubilização (%)
CBH	1
EG	1
Celobiase	-
EG + CBH	55
EG + celobiase	6
CBH + celobiase	20
EG + CBH + celobiase	72
Mistura original	71

Todos estes modelos consideravam a existência de sinergismo entre os componentes celulolíticos. O primeiro sinergismo observado foi demonstrado por Reese, em 1954 (29) mas, só perto dos anos 80, Wood (29) demonstrou a existência de sinergismo entre componentes purificados da *Trichoderma koningi* na celulose do algodão (tab. II.2). Verificou também a existência de sinergismo entre os componentes EG e CBH de diferentes sistemas celulolíticos (29). A celobiase é considerada uma enzima fundamental nos

sistemas celulolíticos, pois hidrolisa a celobiose que é um inibidor da acção hidrolítica das CBHs e em menor extensão das EGs (29, 30, 31).

Recentemente, os avanços no entendimento do mecanismo de acção das celulases passaram, essencialmente, pelo uso de tecnologias genéticas que possibilitaram a separação efectiva dos componentes celulolíticos e da análise detalhada da sua constituição estrutural e funcional (32).

#### 2.4- Constituição Estrutural e Funcional das Celulases

As celulases são constituídas estruturalmente por dois "domínios" que funcionam independentemente (32, 33, 34, 35, 36, 37, 38). Neste arranjo comum, as celulases de diferentes origens possuem um "domínio" catalítico e um outro "domínio" de ligação à celulose (cellulose binding domain, CBD), os quais estão ligados entre si por um polipeptídeo designado por "linker" (fig. II.9). As celulases representam, assim, um tipo completamente diferente de enzimas em que é requerida a presença de dois "domínios", um catalítico e outro de ligação ao substrato sólido, para exercer toda a sua actividade (32).

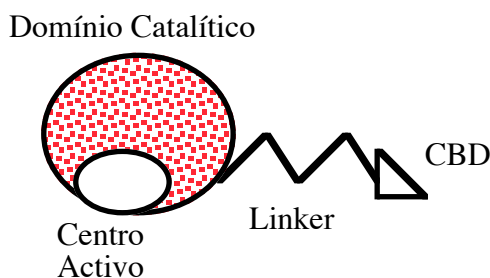


Figura II.9 - Representação esquemática de uma celulase.

No centro activo do domínio tridimensional catalítico processa-se a cisão hidrolítica das cadeias da celulose (fig. II.10). A catálise das ligações glicosídicas 1-4  $\beta$ -D, nesta zona, parece estar essencialmente ligada à presença de aminoácidos com o grupo lateral ácido, como o aspartato ou glutamato (37, 39). Há fundamentalmente dois mecanismos envolvidos, de que resultam diferentes formas estereoquímicas (fig. II.10) (37). Se a configuração é mantida ocorre um mecanismo de deslocamento em duas fases, envolvendo um intermediário enzima-glicósido (fig. II.10 a); se a configuração anomérica for invertida (de  $\alpha$  para  $\beta$ ) ocorre então um mecanismo de deslocamento simples (fig. II.10 b) (37).

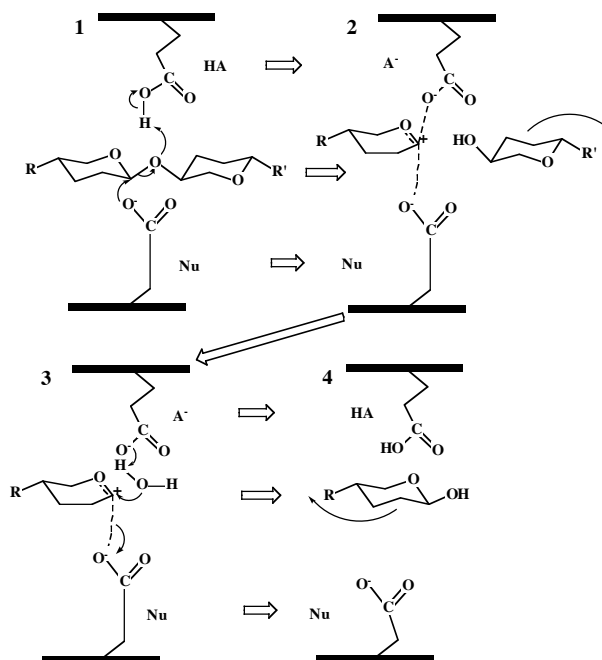


Figura II.10 a) - Representação da possível reacção no centro catalítico das celulases, segundo o mecanismo de deslocamento em duas fases em que a configuração é mantida.

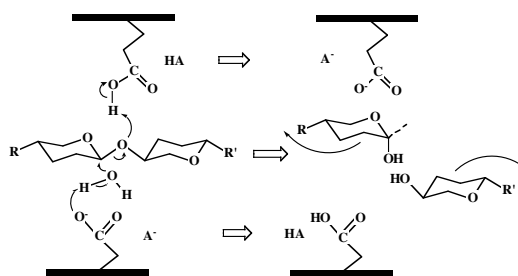


Figura II.10 b) - Representação da possível reacção no centro catalítico das celulasas, segundo o mecanismo de deslocamento simples, em que a configuração é invertida.

O estudo da actividade dos CBDs e dos respectivos domínios catalíticos é feito após proteólise controlada no "linker" do componente celulolítico e posterior separação cromatográfica (37), sendo os CBDs das celulasas do fungo *Trichoderma reesei* e da bactéria *Cellulomonas fimi* os mais estudados. Os fragmentos dos genes relativos aos CBDs destas celulasas foram identificados, isolados e posteriormente expressos noutros microrganismos (35, 36, 37). A sua expressão possibilitou a obtenção destes polipéptidos puros (CBDs), pelo que a sua actividade sobre a celulose pode assim ser estudada individualmente.

A presença de CBD na estrutura proteica das enzimas é essencial para a actividade hidrolítica das celulasas (32, 35, 36, 37, 38). A remoção de CBD das celulasas reduz ou inactiva a actividade sobre a celulose cristalina, não alterando ou podendo mesmo aumentar a actividade sobre a celulose amorfa ou solúvel (35, 36, 37, 38). No entanto, os CBDs não têm actividade hidrolítica detectável (36), embora a acção isolada do CBD duma celulase da *C. fimi* rompa a organização das fibras de algodão, libertando pequenas partículas e aumentando, também, a desfibrilação e o inchamento da celulose (36).

É interessante a observação de sinergismo quando se misturam os dois polipéptidos da mesma proteína relativos ao CBD e ao "domínio" catalítico (36). Parece assim ter-se encontrado nos CBDs o hipotético componente C1 concebido por Reese há mais de 40 anos (36).

O "linker", ou polipeptídeo de ligação, não está directamente envolvido na actividade catalítica das celulasas mas, o encurtamento em 1/3 do linker da CBH I da *T. reesei*, reduz a afinidade da enzima pela celulose (37, 38). O apagamento total do linker reduz a actividade da enzima para um nível semelhante ao do domínio catalítico da CBH I isolado (38). Isto sugere que o "linker" tem uma natureza flexível e facilita a mobilidade dos dois domínios, durante a acção hidrolítica dos componentes celulolíticos (37, 38).

## 2.5- Sistema Celulolítico Produzido Pela *Trichoderma reesei*

A *Trichoderma reesei* é, sem dúvida, o microrganismo celulolítico que tem sido estudado mais intensivamente (8, 22, 32, 33). A *Trichoderma* foi descoberta durante a II Guerra Mundial na Ásia, pela capacidade de destruir os tecidos de algodão das tendas do Exército Americano (33, 40). Em 1950, o grupo de E. T. Reese no Laboratório do Exército Americano (33, 40) identificou o fungo *Trichoderma viride* como sendo o responsável pela degradação dos tecidos das tendas. Nesta altura, já o algodão tinha sido substituído pela poliamida no fabrico das tendas, mas o novo interesse neste fungo residia agora na possibilidade da conversão da biomassa para aproveitamento energético (1, 33, 40). Foram efectuados numerosos estudos no sentido de obter mutantes da *Trichoderma viride*, aumentando a capacidade de produção de enzima e maximizando a capacidade hidrolítica destas (33, 40). A *Trichoderma reesei* é um destes mutantes, sendo-lhe atribuído este nome desde 1977 (33, 40). Presentemente, existem no mercado celulasas da *Trichoderma reesei* provenientes de companhias como a Primalco, Ltd., a Genencor Inc. ou a Novo Nordisk, A/S. Estas enzimas têm actividade máxima a pH = 5 e a 50°C.

A *Trichoderma reesei* produz uma celobiase, duas CBHs (CBH I e a CBH II) e pelo menos quatro EGs (EG I, EG II, EG III e EG V) (37, 38, 39, 41, 42). Os genes destas enzimas foram identificados e isolados (41). Todas as CBHs e EGs possuem um domínio catalítico, um linker e um CBD (fig. II.11), à excepção da EG III que só possui o domínio catalítico (38, 41).

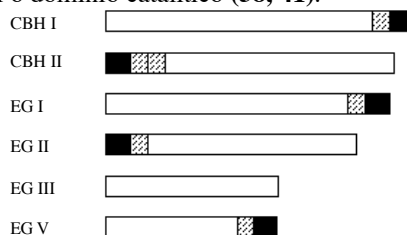


Figura II.11- Estrutura esquemática das celulasas da *Trichoderma reesei*:  - domínio catalítico,  - CBD e  - linker.

Os CBDs de celulasas da *Trichoderma reesei* apresentam uma homologia em cerca de 60 a 70 % da sequência dos seus aminoácidos (33, 33, 41). A CBH I e a EG I também mostram cerca de 45 % de homologia entre os seus aminoácidos (32, 33). O mecanismo de acção da CBH I e da EG II mantém a configuração dos glicósidos, enquanto que a acção de CBH II inverte a sua configuração (37).

As enzimas mais conhecidas são as EG I, EG II, CBH I e CBH II, pois só muito recentemente se isolaram os genes da EG III (42) e da EG V (41). A composição relativa destas quatro celulasas na mistura original é de aproximadamente 60 % de CBH I, 14 % de CBH II, 5 % de EG I e cerca de 1 % de EG II (desconhece-se a composição dos restantes 20 %), conseguindo-se obter a mesma actividade em papel de filtro com uma mistura reconstituída de 75 % de CBH I, 17,5 % de CBH II, 6,25 % de EG I e 1,25 % de EG II (43). Os genes de EG I, EG II, CBH I e CBH II podem ser manipulados, resultando "*Trichoderma reesei* transformantes" em que, nas celulasas produzidas, a actividade de qualquer um dos referidos componentes não se encontra presente (33, 44). Neste trabalho usam-se, por exemplo, celulasas da *T. reesei* em que a actividade em CBH I e CBH II foi inibida ou em que se inibiu a actividade em EG I e EG II.

As CBH I e CBH II altamente purificadas não têm actividade sobre derivados da celulose (CMC ou HEC) (37, 38), muito embora contaminações inferiores a 0,5% de EGs indicem a sua presença por actividade em CMC (38). Ambas, EG I e EG II, possuem uma pronunciada actividade em CMC, sendo a EG I relativamente mais activa que a EG II (38). Todas as enzimas (CBH I, CBH II, EG I e EG II) têm actividade sobre as celulosas cristalinas e amorfas (45, 46) muito possivelmente por possuírem CBD na sua estrutura. A proteólise do CBD de CBH I não altera a actividade em celulose amorfa, mas diminui em 50 % a sua actividade em celulose cristalina (45). Verifica-se que o sinergismo entre os componentes da *T. reesei* diminui com o aumento da concentração de enzima (45, 46, 47), sendo portanto do tipo competitivo. Os componentes que evidenciam maior sinergismo entre si são a CBH I e a CBH II (8, 29, 46). A explicação para este sinergismo deve-se ao facto de CBH I começar o ataque pela extremidade redutora (contrariamente à definição clássica) e de CBH II iniciar o ataque na extremidade não redutora (48). Estes estudos foram efectuados com  $\beta$ - celoligossacáridos solúveis ( $3 \leq DP \leq 6$ ), concluindo-se que ambas EGs mostram um comportamento tipicamente "endo" e as CBHs mostram comportamento tipicamente "exo" (48), verificando-se também, em todas estas celulasas, um comportamento misto (48), tal como já tinha sido observado anteriormente (8).

#### 2.6- Sistema Celulolítico Produzido Pela *Humicola insolens*

A actividade máxima das celulasas da *Humicola insolens* verifica-se a pH = 7.5 e a temperaturas de 55-60°C. Este perfil de temperatura-pH é pouco usual (geralmente para celulasas de outras proveniências: pH = 5 e 50°C ) tendo suscitado interesse para o aproveitamento das celulasas deste fungo para diversas indústrias (têxtil, detergentes, papel e alimentar) (49).

Enzima	EG I	EG II	EG III	EG V	EG VI	CBH I	CBH II
CBD	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim
Mecanismo	M	-	M	I	I	-	I

M - conformação mantida

I - conformação invertida

A *Humicola insolens* produz cinco EGs (EG I, EG II, EG III, EG V e EG VI) e duas CBHs (CBH I e CBH II) (49). As estruturas da EG I, EG V e CBH I foram determinadas (50). Apesar da mistura celulolítica ser mais activa a pH = 7.5, a CBH I é mais activa a pH = 6 e a CBH II a pH = 9, enquanto que a actividade máxima de todas as EGs continua a ser a pH = 7.5 (49). As CBHs não são activas em CMC (49). A CBH I é mais activa em celulose amorfa enquanto que a CBH II é mais activa em celulose cristalina (49). As EGs possuidoras de CBDs têm maior actividade em celulose cristalina (tab. II.3), sendo todas bastante activas em CMC, à excepção de EG III, que tem actividade reduzida em todos os substratos (49).

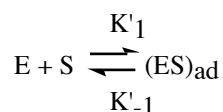
### 3- MODELOS CINÉTICOS E DE ADSORÇÃO RELATIVOS AO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ALGODÃO

A hidrólise enzimática do algodão é um processo complexo, quer do ponto de vista cinético como do de adsorção, devido a factores como: a heterogeneidade do sistema celulase/celulose, a natureza "dúbia" do substrato (coexistindo simultaneamente zonas de maior e de menor ordenação), o sistema multicomponente de celulasas que actuam sinergicamente entre si e a alteração da estrutura do substrato durante o processo de hidrólise (51).

#### 3.1- Modelo de Adsorção



Na interpretação do mecanismo de acção da celulase sobre celulose pode-se considerar que a hidrólise enzimática é precedida por um processo de adsorção da enzima pelo substrato, devido à heterogeneidade do sistema (51, 52, 53, 54). Para este tipo de adsorção pode usar-se o modelo de Langmuir (52, 55) para o equilíbrio de adsorção, representado pela equação:



em que  $(ES)_{ad}$  é o complexo resultante da adsorção da enzima E pelo substrato S,  $K'_1$  e  $K'_{-1}$  são as constantes de adsorção e desadsorção, respectivamente. A equação de Langmuir para este sistema será então

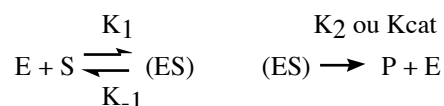
$$\frac{E_{ads}}{E_{max}} = \frac{K \cdot C_e}{1 + K \cdot C_e}$$

em que  $K = K'_1 / K'_{-1}$ ,  $C_e$  = a concentração da enzima livre em solução,  $E_{ads}$  = a quantidade de enzima adsorvida por unidade de peso de algodão,  $E_{max}$  = a quantidade máxima de enzima adsorvida por unidade de peso de algodão. Medindo a variação da concentração de enzima livre num processo de adsorção em função da proteína adsorvida, obtém-se a constante de equilíbrio de adsorção e os "sítios" livres ( $E_{max}$ ) na superfície celulósica onde a enzima se pode localizar.

Existem outros modelos matemáticos para descrever a adsorção das celulasas na celulose, sendo na sua maior parte derivados do modelo de Langmuir (53, 54). Num modelo recente (54), considera-se que a celulose (Sigmacell 50) é constituída por duas zonas de acessibilidade diversa, a parte amorfa e a cristalina. O modelo de Langmuir tem a desvantagem de pressupor um equilíbrio na adsorção das celulasas no substrato. Apesar da hidrólise tornar o processo dinâmico (não equilíbrio), a análise cuidadosa dos parâmetros calculados permite obter informações mecanísticas sobre a catálise enzimática. Na literatura existem descrições da aplicação deste modelo clássico a crudes celulolíticos de *T. viride* (52), a componentes purificados da *T. viride* (55), a CBH I da *T.reesei* (37) e aos CBDs da *C. fimi* (35).

### 3.2- Modelo Cinético

Michaelis-Menten (21) desenvolveram, em 1913, um modelo geral para reacções enzimáticas, propondo as seguintes equações:



(P - produto de reacção)

Neste modelo, assume-se que a velocidade de decomposição do complexo enzima-substrato é muito mais lenta do que a dos processos de adsorção em equilíbrio, sendo a velocidade de reacção dada por:

$$v = \frac{K_2 [E] [S]}{K_M + [S]} \quad \text{em que} \quad K_M = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1}$$

$[E]$  = concentração de enzima,  $[S]$  = concentração de substrato. Se  $V_{max} = K_2 \cdot [E]$  então

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]}$$

Desta equação pode calcular-se o  $V_{max}$  (velocidade máxima quando a enzima está saturada) e o  $K_M$  (constante de meia saturação). Esta última pode ser interpretada como uma constante aparente de dissociação de todas as espécies ligadas à enzima. A razão  $V_{max}/K_M$  dá a especificidade catalítica da enzima em causa (21). Na literatura existem medições destes parâmetros cinéticos relativos à hidrólise com celulasas em substratos cristalinos, como o algodão (51) ou Avicel (55).

No entanto, a medida da velocidade da reacção em função da concentração do substrato é uma convenção artificial (56), uma vez que a reacção enzimática passa-se na celulose hidratada onde é impossível alterar a sua concentração (56). Como já foi referido anteriormente, o sinergismo entre os componentes celulolíticos desaparece a altas concentrações (45, 46, 47) sendo, por isso, um sinergismo competitivo. Por estas razões, foi sugerido que se devia relacionar a velocidade da reacção com a

concentração de enzima (56) em vez de a relacionar com a concentração de substrato. Outro grupo de investigadores, na mesma altura, em estudos sobre o efeito da concentração de enzima, verificou que havia uma relação linear entre o recíproco de concentração de enzima e o recíproco do produto formado, para todos os tempos de hidrólise (57). Estes resultados apontam também para o mesmo tipo de relação sugerida:

$$v = \frac{V_{\max}[E]}{K_e + [E]}$$

Os parâmetros desta nova equação são similares aos do modelo de Michaelis-Menten, mas não podem ser trocados, unicamente porque as concentrações de enzima dificilmente podem ser expressas em unidades molares. Os parâmetros cinéticos, segundo este novo modelo, foram já calculados para a acção de componentes purificados de *T. reesei* sobre o papel de filtro (46). No entanto, para a hidrólise de substratos solúveis ( $2 \leq DP \leq 6$ ) o modelo de Michaelis-Menten continua a ser o mais válido (49).

### 3.3- Alguns Resultados Experimentais da Literatura

Os resultados de estudos de adsorção de crudes de *T. viride* sobre algodão nativo e o algodão mercerizado (52), confirmam que o último tem uma estrutura mais acessível, já que contém maior número de "sítios" livres onde a enzima se pode localizar. Estes ensaios foram efectuados a 5°C, temperatura em que há uma actividade celulolítica muito baixa. Em outros estudos com componentes purificados de *T. viride* sobre Avicel, os ensaios foram feitos a 30°C, e considerou-se que o equilíbrio de adsorção estava completo ao fim de uma hora, desprezando-se a curta extensão da hidrólise do substrato durante este tempo (55). A cinética da celulólise da Avicel é tão lenta que a velocidade inicial só foi medida ao fim de 20 horas (55).

Medidas de cinética, usando o modelo modificado (II.3.2), sobre componentes de *T. reesei* sugerem que ambas CBH I e II são mais rápidas que as EG I e II no ataque à celulose, havendo, no entanto, maior afinidade destas últimas para a celulose (46). Mas, estudos sobre substratos solúveis (43), usando o modelo cinético clássico, provam o oposto, *i. e.*, a maior rapidez das EGs relativamente às CBHs. Nas celulases da *H. insolens*, em geral, as EGs também são mais rápidas que as CBHs (49).

Medidas de adsorção indicam que, a afinidade do CBD de uma celulase de *C. fimi* (35) pela celulose, decresce com a temperatura (4-50°C) e é independente do pH (pH = 3-9). Estes CBDs ligam-se irreversivelmente à celulose, ao contrário do componente intacto, o qual é facilmente eluído com água (35).

## 4- PROCESSAMENTO DO ALGODÃO COM CELULASES

O processamento do algodão com celulases depende de factores como o banho enzimático de tratamento, o tipo de tecido e a maquinaria usada.

### 4.1- Banho Enzimático de Tratamento

A temperatura de aplicação recomendada, para as celulases comerciais usadas no tratamento do algodão, é de cerca de 50°C. Isto é válido para tempos de hidrólise curtos (30 - 90 minutos) tal como se procede nas aplicações têxteis, mas para tempos de hidrólise longos as temperaturas óptimas de aplicação serão mais baixas ( $\approx 40^\circ\text{C}$ ) (49). Para temperaturas superiores a 65°C, estas celulases são inactivadas por desnaturação, sendo este um dos processos de terminar o tratamento do algodão, também chamado choque térmico.

O pH de aplicação é geralmente de 5 para as celulases da *T. reesei* e de 7.5 para a *H. insolens* (49). Pequenas variações de pH podem alterar a actividade da mistura celulolítica, já que a variação de 1.5 unidades de pH para *H. insolens*, vai baixar a actividade de todos os componentes, ficando mais activas a CBH I (pH = 6) ou a CBH II (pH = 9). Na *T. reesei*, só a EG III é mais activa a pH = 5.8 (42), sendo todos os outros componentes activos a pH = 5. Pode-se assim controlar o modo de acção do sistema celulolítico pelo valor do pH do banho de tratamento. Algumas das celulases comerciais da Novo Nordisk para aplicações têxteis contém já tampão na composição de produto comercial. A presença de tampão para manter o pH constante ao longo do tratamento é essencial, já que a formação de produtos de reacção, como a glicose ou a celobiose pode alterar o pH do meio se este não estiver tamponizado (58).

A actividade das celulases de *Irpex lacteus* foi medida em soluções de diversos iões metálicos (59). Verificou-se que havia inibição de actividade sobre CMC e sobre Avicel em soluções de sais com forças iónicas mais elevadas. Forte inibição foi verificada com alguns iões, como Ag (I), Hg (II) e Pb (II). Estes resultados sugerem que deve ter-se especial cuidado ao escolher o tipo de tampões e moderar as suas concentrações. Contudo, para os tratamentos de tecidos, a concentração de tampão deverá ser suficientemente alta para manter constante o pH do meio.

A influência da força iónica confirma-se pela inibição da acção celulolítica de *T. viride* com a concentração de surfactantes comerciais aniónicos e catiónicos, no algodão hidrófilo (60), não se tendo verificado qualquer influência do surfactante não iónico. Outro estudo relata a acção sinérgica entre as

celulases e a acção de surfactantes não iónicos, como os da "Tween Series", na hidrólise de papel de jornal usado (61).

#### 4.2- Tecido de Algodão

As fases de ultimateção a molhado dum tecido de algodão são, essencialmente, o tratamento prévio, o tingimento e os acabamentos finais (9, 10). No tratamento prévio são eliminadas todas as impurezas do tecido, podendo efectuar-se também, nesta fase, a mercerização se isso for requerido para o uso final do tecido. No tingimento são aplicados os corantes ao tecido, podendo ainda haver tecidos que são tingidos e/ou estampados. Nos acabamentos finais aplicam-se amaciadores, resinas ou qualquer outro tipo de auxiliares conforme o uso final do tecido. O acabamento com celulases é geralmente feito nos acabamentos finais ou nas peças já confeccionadas (2), importando assim, saber qual a influência de cada uma destas fases de ultimateção na acção das celulases.

O algodão é mais susceptível de ser hidrolisado no fim do tratamento prévio, porque nesta fase, todas as impurezas foram eliminadas e o algodão é mais hidrófilo, facilitando a acção das celulases (62). As celulases praticamente não actuam sobre as fibras de algodão, devido à cutícula exterior de gorduras e de pectinas (62). A operação de mercerização sobre o algodão aumenta a acção das celulases como aqui já foi observado, sendo extensamente referido na literatura (52, 63, 64, 65).

Recentemente foram efectuados estudos sobre a influência de corantes (directos, cubas e reactivos fixados algodão) na acção das celulases (65, 66). Observou-se que a acção das celulases é reduzida pela presença de concentrações crescentes de corantes reactivos e directos no algodão, enquanto que, a presença de corantes de cuba não altera a acção das celulases, medida como perda de peso. Foi sugerido que os corantes directos e reactivos, devido ao seu tamanho e ao número de cargas iónicas contidas na sua estrutura impediriam a acção das celulases no algodão (65). Observou-se também que, o aumento da concentração de corante reactivo no tecido diminui a acção da mistura celulolítica bruta, não influenciando a acção da mistura celulolítica com actividade tipicamente "endo" (66). Verificou-se ainda que, o líquido resultante da hidrólise dos tecidos tingidos com reactivos é corado, enquanto que nos tecidos tingidos com directos ou cubas é incolor (66). Isto sugere que o corante reactivo, ligado covalentemente à celulose, origina que esta se comporte como um derivado da celulose, onde as CBHs teriam uma acção reduzida (66). O facto da acção da celulase originar oligossacáridos solúveis ligados ao corante é a base dum método de medição de actividades celulolíticas proposto há já 20 anos (67).

A presença no tecido de agentes de acabamento, tais como resinas, amaciadores gordos e agentes polifenólicos, usados para impedir o encolhimento, inibem geralmente a acção das celulases por impedirem o acesso as fibras ou pela sua constituição química (2).

Não só os tratamentos anteriormente referidos influenciam a acção das celulases sobre o algodão, mas também o aumento da densidade de fios no tecido vai diminuir a extensão da hidrólise, devido à menor acessibilidade das enzimas às fibras (66). Os tecidos de fios originários de fição "open-end" são também mais susceptíveis ao ataque celulolítico que os de fios originários de fição convencional.

#### 4.3- Maquinaria

O acabamento a molhado de tecidos de algodão é feito por processos de impregnação ou por processos de esgotamento (68). Nos processos de impregnação, podem ter-se vários tipos de maturação, como se pode observar no esquema da figura II.12. Nos processos de esgotamento para tratamento de tecidos existem máquinas como *jets*, *jiggers* e *barcas* (fig. II.12). Para o acabamento de peças de algodão já confeccionadas são geralmente usados tambores rotativos de lavar (máquinas de lavar). Nestes processos, a acção mecânica sobre os tecidos é inexistente em processos de impregnação, mínima em *jiggers*, intermédia em *barcas* e bastante vigorosa em *jets* e tambores rotativos de lavar. O uso de celulases no processamento de tecidos de algodão recorre precisamente a maquinaria em que existe uma acção mecânica considerável sobre os tecidos como *jets*, *barcas* e tambores rotativos de lavar (máquinas de lavar) para o processamento de peças de algodão já confeccionadas (2).

Não são conhecidos estudos na literatura, para além dos resultados desta tese, relacionando o efeito da acção mecânica nos tratamentos com celulases no algodão (66). A acção mecânica fornecida por máquinas do tipo *jet*, *barca* ou tambor rotativos de lavar industrial pode ser classificada do seguinte modo:

- fricção fibra-fibra
- fricção fibra-metal
- batimento

acções estas semelhantes ao tipo de agitação existente nas máquinas de pisoamento para a feltagem da lã (9). A acção mecânica nos tambores de lavagem é essencial na remoção da sujidade dos tecidos (69): aumenta a penetração do banho detergente nas fibras, esperando-se assim remover as partículas de sujidade (70). A acção mecânica sobre os tecidos durante o processamento provoca, essencialmente, desfibrilação e libertação de fibras soltas, conforme o observado em imagens de microscopia electrónica (71).

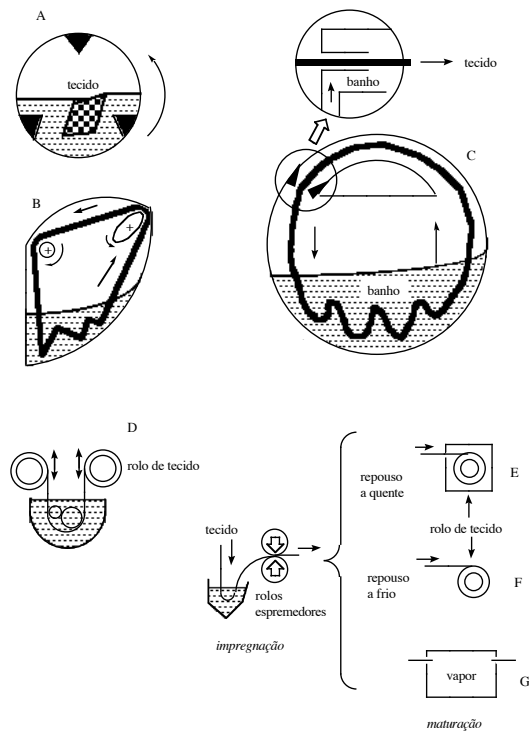


Figura II.12- Esquema de (68): A- Máquina de lavar (tambor), B- Barca de sarilho, C- Jet, D- Jigger, E- Pad-Roll (impregnação e maturação em câmara a quente), F- Pad- -Batch (impregnação e maturação a frio) e G- Pad- Steam (impregnação e maturação em câmara de vapor).

## 5- ALTERAÇÕES MENSURÁVEIS NO SUBSTRATO APÓS O TRATAMENTO ENZIMÁTICO

Os parâmetros mensuráveis no substrato (tecido de algodão) tratado podem dividir-se em dois grupos (72). O primeiro, de natureza química e estrutural, inclui parâmetros como a viscosidade de soluções de celulose do algodão, o poder redutor do algodão, a cristalinidade, a recuperação de humidade, a afinidade colorística e a hidrofiliidade. O segundo grupo, de natureza mecânica, inclui parâmetros como a resistência dos tecidos, o grau de "pilling" e as propriedades mecânicas relacionadas com o toque de tecidos.

### 5.1- Parâmetros Químicos e Estruturais

A medição da viscosidade de soluções de celulose em cuproetilenodiamina (CED) é um dos métodos mais comuns de determinar o grau de polimerização da celulose (20). A relação de Mark-Howink (20) relaciona a viscosidade intrínseca  $[\eta]$  com o grau de polimerização, DP, pela expressão:

$$[\eta] = \Phi \cdot DP^\alpha$$

em que  $\Phi$  e  $\alpha$  são constantes empíricas (20). O grau de polimerização pode também ser determinado pelo estudo cromatográfico da distribuição de derivados de celulose, como a tricarbonilcelulose (73). A hidrólise enzimática da celulose geralmente reduz o seu grau de polimerização (1, 64, 73, 74), dependendo esta diminuição, essencialmente, da actividade em endoglucanase (1). A distribuição dos pesos moleculares, após a hidrólise enzimática da celulose, parece variar segundo a eliminação das cadeias mais curtas e a eliminação sequencial cadeia a cadeia (73), pois que, por vezes, após tratamentos curtos, a viscosidade das celuloses tratadas aumenta (64). A hidrólise ácida diminui mais acentuadamente a viscosidade das soluções de celulose do que a hidrólise enzimática (64).

A determinação do poder redutor dá o número de grupos terminais redutores, como foi descrito anteriormente (cap. II.1.3). O poder redutor é função do grau de polimerização, podendo ser também relacionado com a actividade em endoglucanase (75).

O declive da relação entre a fluidez (inverso da viscosidade específica) e o número de grupos terminais em polímeros, indica se a despolimerização foi aleatória ou localizada. Existem estudos deste tipo em que se relaciona o modo de acção de diferentes EGs com o declive da fluidez versus poder redutor das soluções de CMC (22). Para o algodão, só existem estudos relacionando o poder redutor com a fluidez para o tratamento com ácidos fortes (10).

A cristalinidade é determinada por difracção de raios X (76), podendo também ser determinada pela razão de diferentes bandas de absorção dos espectros de infra-vermelho (77). A cristalinidade pode ser calculada pela fórmula proposta por Chidambareswaran, *et al* (76):

$$Cr = \frac{\left( \frac{I_{002} - I_{10\bar{1}}}{2} \right) - I_{18^\circ}}{\left( \frac{I_{002} - I_{10\bar{1}}}{2} \right)}$$

em que  $I_{002}$ ,  $I_{10\bar{1}}$  e  $I_{18^\circ}$  são as intensidades medidas directamente do difractograma (fig. II.13).

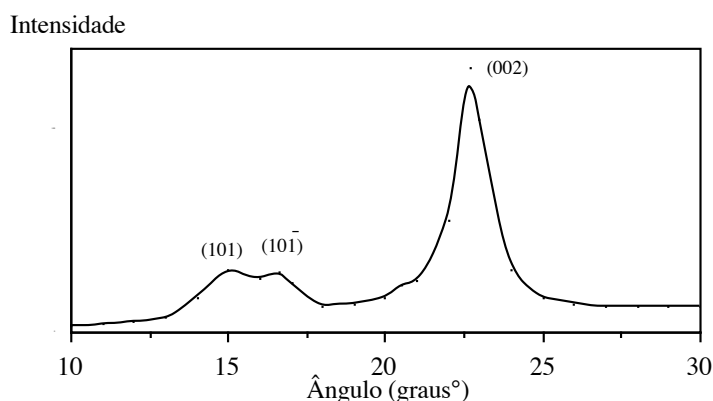


Figura II.13 - Difractograma da celulose do algodão nativo onde se mostra a localização dos picos mais importantes (78)

Existem outras fórmulas para calcular a cristalinidade (64, 73), somente pela relação entre  $I_{002}$  e  $I_{18^\circ}$ , sendo válidas para determinação da cristalinidade da celulose I, enquanto que o método de Chidambareswaran, *et al* é válido para a cristalinidade total com outras formas de celulose (76).

Não são encontradas, no entanto, variações sensíveis na cristalinidade da celulose e na sua acessibilidade após o tratamento enzimático (22, 29, 73, 79). A afinidade colorística e a recuperação de humidade são também medidas da acessibilidade no algodão (72, 74), não sofrendo alterações significativas após o tratamento enzimático (72,74, 79). Como as alterações de cristalinidade não são significativas, as observações da formação de microfibrilas à superfície dos tecidos, por hidrólise enzimática, são responsáveis pelo aumento da retenção de água em cerca de 25% nos tecidos de algodão (79).

## 5.2- Parâmetros Físicos e Mecânicos

A resistência é medida pela força de rebentamento de uma tira de tecido, de um fio ou das fibras (80). Os tratamentos enzimáticos conduzem sempre a perda de resistência nos tecidos (4, 60, 63, 72), nos fios (79) e nas fibras (62). O alongamento à rotura, no rebentamento das tiras de tecido, não tem sido considerado nestes estudos, por ser uma medida pouco reprodutível nos tecidos tratados com celulases (72).

Não são conhecidos estudos sobre a variação do grau de "pilling" com a extensão do tratamento celulolítico, apesar de este ser considerado um processo para remoção da pilosidade dos tecidos (2), tendo só sido feitas comparações fotográficas entre os tecidos tratados (3, 4).

O toque de tecidos pode ser avaliado por propriedades mecânicas, como a tracção, o corte, a flexão, a compressão, as de superfície e as de construção do tecido (81). Recentemente, têm sido também consideradas as propriedades termomecânicas, que avaliam a sensação quente-frio pela capacidade que o tecido tem de absorver calor (82). De um modo geral, o tratamento com celulases diminui o valor das propriedades de flexão e de corte (63, 72, 79) e aumenta a absorvidade térmica (83). A variação destas propriedades dá uma ideia da variação do toque dos tecidos. Entende-se assim por "toque", o conjunto de sensações, tais como, rigidez ou flexibilidade, maciez ou aspereza, dureza ou moleza e quente ou frio, podendo-se relacionar este conjunto de sensações tácteis com as propriedades mecânicas do tecido (84, 85, 86). Foi proposta recentemente uma metodologia, que usa análise multivariada, para representação dos inúmeros parâmetros mecânicos e possíveis sensações tácteis num mapa de vectores, permitindo assim visualizar de que modo varia o toque do tecido após uma operação de acabamento (87).

## **6- CONSIDERAÇÕES FINAIS E OBJECTIVOS DA TESE**

O objectivo geral desta tese é o esclarecimento dos mecanismos de hidrólise com celulases durante o processamento do algodão. A primeira referência bibliográfica sobre o uso de celulases no acabamento do algodão é de 1988, numa publicação do Japão (2, 3). Os efeitos conseguidos no algodão por acção das celulases e o controle dos tratamentos têm uma base essencialmente empírica e por interesses técnico-comerciais a bibliografia disponível é escassa. Estes factos indicam a necessidade de estudos científico-técnicos mais aprofundados, que possam servir de base à resolução de problemas encontrados pelos utilizadores de celulases no processamento têxtil do algodão.

Os maiores avanços no entendimento do mecanismo da hidrólise enzimática da celulose deram-se nos últimos 4-5 anos, após a obtenção dos componentes celulolíticos e das suas partes estruturais (por proteólise) depois de muitos passos cromatográficos e electroforéticos de purificação. A obtenção de alguns componentes purificados só foi possível após isolamento dos genes correspondentes e da sua expressão em outros microrganismos (37).

Para se entenderem os efeitos produzidos no algodão pelas celulases, dever-se-á estudar o efeito da composição do sistema celulolítico usado nas condições reais de processamento. O facto de toda a maquinaria usada nos acabamentos com celulases fornecer uma forte agitação mecânica, levanta a questão de qual o papel da agitação mecânica na acção dos componentes celulolíticos e a razão pela qual se não conseguem obter os mesmos efeitos por técnicas de impregnação.

Os objectivos específicos deste trabalho são então:

- 1 - Estudar o efeito da composição enzimática no processamento celulolítico do algodão.
- 2 - Estudar o efeito da acção mecânica no processamento celulolítico do algodão.
- 3 - Estudar a relação entre as propriedades dos tecidos tratados e as condições de processamento, variando a composição enzimática e o grau de acção mecânica aplicado.

### III - MATERIAIS E METODOLOGIAS

#### 1- MATERIAIS

##### 1.1-Tecidos

Nos estudos efectuados foram usados três tecidos de tafetá simples 100 % de algodão. Os tecidos serão designados respectivamente ao longo do texto por **popelina**, **popelina mercerizada** (ou só **mercerizado**) e **flanela**. Os primeiros dois tecidos foram obtidos na empresa ETA, SA. O tecido popelina foi submetido previamente a um processo combinado de descolagem oxidativa e fervura alcalina. Como na descolagem o oxidante usado é o peróxido de hidrogénio, diz-se que no fim deste pré-tratamento a popelina tem "meia branqueação". O tecido mercerizado (popelina mercerizada) teve o mesmo tipo de tratamento prévio seguido de mercerização industrial. Foi ainda usado outro tipo de tecido de diferente origem, gentilmente cedido pela empresa Lameirinho. Este tecido (flanela) também foi submetido a uma meia branqueação, tendo-lhe sido posteriormente levantado o pêlo numa operação de cardação mecânica.

Para reduzir ao mínimo a interferência de metais durante os tratamentos enzimáticos lavaram-se todos os tecidos, com agitação reduzida (segundo a ISO 6330), numa Electrolux Wascator FOM 71, durante 1 hora, com molhante (0,1 gr/l de Lenetol B conc., ICI) e sequestrante (1 gr/l de Trilon TB pó, BASF) a 75°C, enxaguados 15 minutos a 50°C, centrifugados 5 minutos e secos ao ar.

Na tabela III.1 estão referidas as especificações dos tecidos lavados.

Parâmetros	Método Usado	popelina	mercerizado	flanela
Nº Passagens por cm	BS 2471	32	30	15
Nº Fios por cm	BS 2862	60	60	21
Massa/área (g/m <sup>2</sup> )	BS 2471	100	100	160
Grau de "Pilling"	ASTM 3512	5	5	1
Factor de Cobertura	BS 2865	318	304	229
Cinzas (%)	AATCC Test 78-1989	<0,1	<0,1	<0,1
Teor em gorduras (%)	AATCC Test 97-1989	<0,01	<0,01	<0,01

##### 1.2- Fibras

As fibras, sob a forma de uma fita 100 % de algodão, foram gentilmente cedidas pelo arquivo do CITEVE. Para reduzir ao mínimo a interferência de gorduras e de metais trataram-se as fibras no tambor de lavagem do MATHIS LAB MAT BFA-8, a 65 rpm, durante 1 hora, com 10 g/l de soda cáustica, molhante (0,2 g/l de Lenetol B conc., ICI) e sequestrante (1 g/l de Trilon TB pó, BASF) a 100°C, enxaguados 15 minutos a 50°C, centrifugados 5 minutos e secos ao ar.

Na tabela III.2 estão referidas os parâmetros das fibras lavadas.

Parâmetros	Método Usado	fibras
Micronaire	a	4,0
Comprimento Médio (mm)	a	23
Índice de Uniformidade (%)	a	81
Conteúdo em Fibras Curtas (%)	a	9
Resistência (gf/tex)	a	40
Cinzas (%)	AATCC Test 78-1989	<0,1
Teor em gorduras (%)	AATCC Test 97-1989	<0,1

a-Manual do HVI 4000, Siegfried Peyer AG, 1990, Suíça

##### 1.3- Celulases

As celulases usadas neste trabalho têm proveniências diversas (tab. 3), tendo actividade máxima a pH = 5 (celulases ácidas) ou a pH = 7 (celulases neutras).

A Cellusoft L e a Denimax T são marcas da Novo Nordisk (Dinamarca) e são usadas correntemente para a remoção do pêlo/fibras soltas da superfície dos tecidos (biopolimento) e na obtenção do aspecto usado de artigos de algodão (ex. aspecto lavado nos artigos Denim),

respectivamente. A SP492-PPC3617 é uma endoglucanase da *Humicola insolens* gentilmente cedida pela Novo Nordisk, não sendo produto comercial.

A Alko (actualmente designada por Primalco, Finlândia) cedeu gentilmente três celulases diferentes, sendo uma delas, todo o crude celulolítico produzido pelo fungo *Trichoderma reesei* e as outras duas celulases, crudes onde se apagou a actividade de EG I e EG II ou a de CBH I e CBH II.

O VTT Biotechnology & Food Research (Finlândia) também cedeu gentilmente, para realização de alguns ensaios, os componentes CBH I e a EG I purificados do crude produzido pela *Trichoderma reesei*.

Na tabela III.3 encontra-se descrita a informação disponível sobre as celulases usadas.

Designação / Marca	Origem	Fornecedor	Referência
Cellusoft L †	<i>Trichoderma reesei</i>	Novo Nordisk	Cel.
Denimax T *	<i>Humicola insolens</i>	Novo Nordisk	Den.
SP492-PPC3617 *	<i>Humicola insolens</i>	Novo Nordisk	EG
CE 883042 †	<i>Trichoderma reesei</i>	Primalco	Crude total (CT)
CE 519/92 †	<i>Trichoderma reesei</i>	Primalco	C-EG I & II
CE 523/92 †	<i>Trichoderma reesei</i>	Primalco	C-CBH I & II
CBH I †	<i>Trichoderma reesei</i>	VTT	CBH I
EG I †	<i>Trichoderma reesei</i>	VTT	EG I

†- celulases ácidas

\*- celulases neutras - recomendado pH = 7 de aplicação (58), muito embora na referência 49 se encontre pH = 7,5 para a mistura de *H. insolens*.

## 2- METODOLOGIAS

### 2.1- Determinações Espectrofotométricas

Utilizou-se um espectrofotómetro de Ultravioleta/Visível, modelo Hitachi U-2000, com cuvetes de vidro, com percurso óptico de 1 cm. Todas as determinações espectrofotométricas foram realizadas em triplicado para cada ensaio.

#### 2.1.1- Determinação da Concentração em Açúcares Redutores Totais

A determinação dos açúcares redutores baseia-se no facto destes reduzirem quantitativamente, em meio alcalino, o quelato de neocuproina-Cu (II) a neocuproina-Cu (I), que é um composto de cor alaranjada. Para isso, adicionam-se a 0,05 ml de amostra, 2 ml de carbonato de sódio a 2 % (Carlo Erba, pa) e 5 ml de reagente de neocuproina/cobre [0,2 g de sulfato de cobre (II) pentahidratado (Merck, pa) com 0,4 g de cloreto de neocuproina (Merck, pa), dissolvidos em 1 L de água destilada]. Incuba-se a mistura em banho de água a ferver durante 5 minutos e juntam-se 10 ml de água destilada. Lê-se a densidade óptica, a 475 nm, contra um branco, com ambos os reagentes.

$$\text{Absorvância} = (0,006 \pm 0,004) + (3,95 \pm 0,03) \cdot \text{Concentração}$$

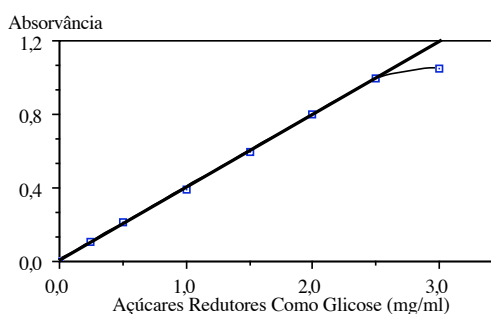


Figura III.1- Recta de calibração e respectiva equação, para as seis primeiras concentrações de glicose (0,25 - 2,50 mg/ml) para determinação de açúcares redutores como glicose a 475 nm.

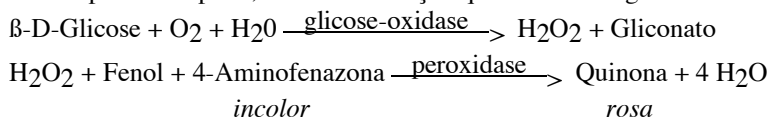
Na figura III.1, apresenta-se a recta de calibração obtida, destacando-se a zona de linearidade onde o método é válido (0-2,5 mg/ml) para os açúcares redutores totais como glicose. A curva de calibração efectuada foi guardada na memória do espectrofotómetro. Por cada conjunto de ensaios numa incubação foi corrigida a recta utilizando um padrão de 1 mg/ml de glicose (D+glicose anidro, Merck, para bioquímica). Esta técnica foi adaptada da descrita para a determinação automática com o auto-analisador de açúcares redutores, apresentado por Evans *et al* (13).

#### 2.1.2- Determinação da Concentração em Glicose

A determinação da concentração de glicose foi feita pelo método da glicose-oxidase, usando a metodologia e o kit de reagentes de Reactivos Spinreact, SA, Girona, Espanha. O kit consiste num padrão



de glicose 0,1 mg/ml e uma solução reagente com glicose-oxidase, peroxidase, 4-aminofenazona e fenol em tampão TRIS pH 7,5. A determinação quantitativa de glicose baseia-se nas seguintes reacções:



Misturam-se 0,02 ml de amostra com 2 ml de solução reagente e incuba-se, 30 minutos, à temperatura ambiente. Lê-se a densidade óptica, a 505 nm, contra um branco de solução reagente. O método aplica-se para concentrações até 0,5 mg/ml de glicose, diluindo-se as amostras com concentrações superiores.

### 2.1.3- Determinação da Concentração em Proteína

Para a determinação da concentração de proteína utilizou-se o método de Bradford (88). Este método baseia-se no facto do corante ácido Coomassie Brilliant Blue G 250 (Merck, pa) ter uma cor vermelha, que muda para azul quando está ligado a uma proteína. Para determinações de amostras com concentrações entre 0,1-1,4 mg/ml de proteína, misturam-se 5 ml do reagente Coomassie [dissolver 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G 250 em 50 ml de etanol 95% (Carlo Erba, pa), adicionando depois 100 ml de ácido fosfórico concentrado (Carlo Erba, pa) com posterior diluição até 1 L com água destilada] com 0,1 ml de proteína e lê-se a densidade óptica, a 595 nm, contra um branco de reagente Coomassie com o tampão da proteína. O padrão de proteína usado foi Albumina Sérica de Bovino (Merck, pa).

### 2.2- Determinação das Actividades Enzimáticas (13, 30)

As actividades foram determinadas em tampão pH = 5 [0.1 M de ácido acético (Carlo Erba, pa) e hidróxido de sódio (Carlo Erba, pa)] para celulasas ácidas e pH = 7 [0.1 M de ácido fosfórico (Carlo Erba, pa) e hidróxido de sódio] para as celulasas neutras. Excepto no caso da actividade no algodão, que é expressa em perda de peso, todas as outras actividades são expressas em termos de Unidades (U). Uma Unidade é 1  $\mu$ mole por minuto de substrato convertido, podendo-se aplicar a fórmula geral:

$$1U = \frac{[C] \cdot Vt}{0,18 \cdot T \cdot [E] \cdot Ve} \cdot a$$

em que [C] é a concentração em glicose (celobiose) ou açúcares redutores (outros substratos) em mg/ml; Vt e Ve são os volumes totais e da solução da enzima; T é o tempo de incubação; [E] é a concentração de enzima, que em todos os casos se fez igual a 1 mg/ml; a tem o valor 0,5 para a celobiose e 1 para os outros substratos, pois para cada mole de celulose convertida obtém-se uma mole de açúcares redutores e para uma mole de celobiose convertida obtém-se duas moles de glicose. Os ensaios de actividades realizaram-se em triplicado.

#### 2.2.1- Actividade em Carboximetilcelulose (13)

Para medir as actividades, preparou-se de véspera, uma solução de carboximetilcelulose (CMC) (BDH, sal de sódio, alta viscosidade) a 0.5 % (massa/volume). A 2 ml de substrato preparado anteriormente, juntaram-se 2 ml de enzima diluída em tampão. Incubou-se a 50°C (Mermet Bath) durante 30 minutos e determinaram-se os açúcares redutores totais.

#### 2.2.2- Actividade em Celulose Avicel Inchada com Ácido Fosfórico (13)

##### 2.2.2.1- Preparação da Celulose Avicel Inchada com Ácido Fosfórico (CAIAF)

Formou-se uma pasta com 20 gr de Celulose Avicel (Merck, Celulose microcristalina para cromatografia) com 50 ml de ácido fosfórico, num copo, em banho de gelo. Juntaram-se 3 litros de água e deixou-se repousar 3 horas no frigorífico. Filtrou-se a suspensão num funil com lâ de vidro. Lavou-se com água e com solução de carbonato de sódio a 1% até pH neutro. Lavou-se com água novamente. Triturou-se (Heidolph) durante 4 horas e diluiu-se até 0.5 litros, de modo a ficar com concentração de 5 mM em NaN<sub>3</sub> (Merck, pa). A solução de CAIAF (40 g/l) pode ser usada, no mínimo até seis meses após a sua preparação, se convenientemente guardada a 2-6°C (13).

##### 2.2.2.2- Medição da Actividade em CAIAF

A 2 ml de substrato preparado anteriormente, juntaram-se 2 ml de enzima diluída em tampão. Incubou-se a 50°C durante 60 minutos e determinaram-se os açúcares redutores totais.

#### 2.2.3- Actividade em Celobiose (13)

Para medir a actividade, preparou-se no dia anterior, uma solução de Celobiose (D+Celobiose anidro, Fluka, para bacteriologia) a 0.4 % (peso/volume). A 2 ml de substrato preparado anteriormente, juntaram-se 2 ml de enzima diluída em tampão pH=5 (ácido acético/hidróxido de sódio 0.1 M). Incubou-se a 50°C durante 120 minutos. Determinou-se a concentração de glicose.

#### 2.2.4- Actividade em Tecido de Algodão

Num copo reactor do Linitest (Original Hanau) de 250 ml, adicionaram-se a 10.0 gramas de tecido de algodão - popelina, 100 ml de enzima diluída em tampão. Incubou-se a 50°C, durante 60 minutos, com 65 rpm e determinou-se a perda de peso como o descrito nos testes de controle.

### 2.3- Tratamentos Enzimáticos

Em todos os tipos de tratamento efectuaram-se dois ensaios, excepto no tratamento das fibras de algodão em que se efectuaram três e no caso da enzimas purificadas em que se efectuou apenas um. Em todos os tratamentos, as amostras referenciadas como não tratadas, foram lavadas com a solução tampão sem enzima, para controlo da variação das propriedades dos tecidos.

### **2.3.1- Efeito da Concentração de Enzima**

Os substratos popelina, popelina mercerizada, flanela e as fibras lavadas foram tratadas com 0.1, 0.5, 1 e 2 g/l de celulase. Por ensaio usaram-se 10 g de fibra para 100 ml de solução de enzima em tampão 4.8 (acetato, 0.5 M) para Cellusoft L ou tampão 7.0 (fosfato, 0.5 M) para Denimax T. O tratamento foi efectuado a 50°C e durou 60 minutos. Os tecidos e fibras foram lavados com carbonato de sódio a 10 % e, posteriormente, em água fria e quente. Retirou-se 2 ml de banho de tratamento a que se adicionou 2 ml de carbonato de sódio a 10 % para determinação de açúcares redutores na solução. Os tratamentos foram efectuados nos copos reactores, de 500 ml, do Linitest (Original Hanau) com *baixa fricção mecânica* (BFM), a 65 rpm. O tratamento com *alta fricção mecânica* (AFM) é igual ao BFM, mas é conseguido juntando no copo reactor 12 discos de aço usados na solidez a lavagem a seco.

### **2.3.2- Efeito do Pré-Tratamento com Endoglucanase no Tratamento com Cellusoft L**

#### **2.3.2.1- Pré-Tratamento/Tratamento com Endoglucanase**

A popelina (10 gramas) foi tratada com 100 ml de solução com concentração de 1 g/l de endoglucanase SP492-PPC3617 em tampão 7.0 (fosfato, 0.5 M). Os tecidos foram tratados durante 20, 40, 60 e 120 minutos a 50°C, e após tratamento, foram lavados com carbonato de sódio a 10 % e posteriormente em água fria e quente. Retirou-se 2 ml de banho de tratamento a que se adicionou 2 ml de carbonato de sódio a 10 % para determinação de açúcares redutores na solução. Os tratamentos foram efectuados nos copos reactores de 500 ml do Linitest (Original Hanau) com *baixa fricção mecânica* (BFM) a 65 rpm. O tratamento com *alta fricção mecânica* (AFM) é igual ao BFM, mas é conseguido juntando no copo reactor 12 discos de aço usados na solidez a lavagem a seco.

#### **2.3.2.2- Tratamento com Cellusoft L**

A popelina não tratada e pré tratada anteriormente (10 gramas) foi tratada com 100 ml de solução com concentração de 1 g/l de solução de Cellusoft L em tampão 4.8 (acetato, 0.5 M). Os tecidos foram tratados durante 30, 60 e 120 minutos a 50°C e, após tratamento, foram lavados com carbonato de sódio a 10 % e posteriormente em água fria e quente. Retirou-se 2 ml de banho de tratamento a que se adicionou 2 ml de carbonato de sódio a 10 % para determinação de açúcares redutores na solução. Os tratamentos foram efectuados nos copos reactores de 500 ml do Linitest (Original Hanau) com *baixa fricção mecânica* (BFM) a 65 rpm. O tratamento com *alta fricção mecânica* (AFM) é igual ao BFM, mas é conseguido juntando no copo reactor 12 discos de aço usados na solidez a lavagem a seco. Os tecidos pré-tratados com BFM foram tratados seguidamente com BFM, assim como os pré-tratados com AFM foram tratados seguidamente com AFM.

#### **2.3.3- Tratamento Curto por "Crudes" de *Trichoderma reesei***

Os tecidos (popelina) foram tratados com crudes celulolíticos de *Trichoderma reesei* diluídos 1/500. Por ensaio usou-se 10 g de fibra para 200 ml de solução de enzima em tampão pH = 4.8 (acetato, 0.5 M). O tratamento foi efectuado a 50°C e durou 30, 60, 120 e 240 minutos. Os tecidos e fibras foram lavados com carbonato de sódio a 10 % e posteriormente em água fria e quente. Os tratamentos foram efectuados nos copos reactores de 250 ml do Linitest (Original Hanau) a 65 rpm.

#### **2.3.4- Tratamento Longo por "Crudes" de *Trichoderma reesei***

Os tecidos (popelina) foram tratados com crudes celulolíticos de *Trichoderma reesei* diluídos 1/60 para C-CBH I & II e diluídos 1/120 para os restantes crudes. Por ensaio usou-se 5 g de fibra para 250 ml de solução de enzima em tampão pH = 4.8 (acetato, 0.5 M). O tratamento foi efectuado a 50°C e durou 3, 6 e 13 dias num matraz rolhado dentro de uma incubadora HERAEUS. Os tecidos e fibras foram lavados com carbonato de sódio a 10 % e posteriormente em água fria e quente.

#### **2.3.5- Cinética e Adsorção de "Crudes" de *Trichoderma reesei***

Por ensaio usou-se 3,0 g de tecido (popelina) para 100 ml de solução de enzima em tampão pH = 4.8 (acetato, 0.1 M). Usaram-se concentrações iniciais de enzima entre 0.02 e 0.43 g/l de celulase. Os ensaios foram efectuado a 50°C e, após 30 minutos, retirou-se uma amostra do banho para determinação dos açúcares redutores totais e concentração de proteína. Os ensaios foram repetidos três vezes, tendo sido feita uma média. Os ensaios foram efectuados nos copos reactores de 250 ml do Linitest (Original Hanau) com *baixa fricção mecânica* (BFM) de 65 rpm. Os ensaios com *alta fricção mecânica* (AFM) são iguais a BFM, mas são conseguidos juntando no copo reactor 12 discos de aço usados na solidez a lavagem a seco. Considerou-se o valor de 30 minutos para a determinação da velocidade inicial, como sendo o tempo suficiente para atingir o equilíbrio entre a enzima adsorvida e a enzima livre.

#### **2.3.6- Mistura de "Crudes" de *Trichoderma reesei***

As misturas foram feitas em tampão pH = 4.8 (acetato, 0.1 M) entre C-CBH I & II (diluição 1/50) e C-EG I & II (diluição 1/100) com composições de 0, 25, 50, 75 e 100 % . Foram feitas comparações entre os resultados destas misturas e a celulase total (CT, diluição 1/50).

#### **2.3.6.1- Tratamentos a 50°C**

Por ensaio usou-se 10 g de popelina para 100 ml de solução de enzima em tampão. O tratamento foi efectuado a 50°C e durou 30 minutos. Os tecidos e fibras foram lavados com carbonato de sódio a 10 % e posteriormente em água fria e quente. Os tratamentos foram efectuados nos copos reactores de 500 ml do Linitest (Original Hanau) com *baixa fricção mecânica* (BFM) a 65 rpm. O tratamento com *alta fricção mecânica* (AFM) é igual ao BFM, mas é conseguido juntando no copo reactor 15 discos de aço usados na solidez à lavagem a seco.

#### **2.3.6.2- Simulação de Tratamento Pad-Batch a 20°C**

Por ensaio usou-se 20 g de popelina para 150 ml de solução de enzima em tampão. O tratamento foi efectuado a 20°C e durante 3 dias, num matraz rolhado em ambiente padronizado (STULZ COMPTRON 1001). Os tecidos e fibras foram lavados com carbonato de sódio a 10 % e posteriormente em água fria e quente.

#### **2.3.6.3- Lavagem com Alta Fricção Mecânica (AFM)**

Para obter o efeito da fricção mecânica lavaram-se os tecidos tratados em 2.3.6.2 numa Electrolux Wascator Fom 71 Lab, com agitação mecânica máxima (segundo ISO 6330), só com água e sem qualquer outro produto, a 50°C, durante 1 hora.

#### **2.3.7- Cinética de CBH I e EG I da *Trichoderma reesei***

Por ensaio usou-se 9.0 g de tecido popelina para 100 ml de solução de enzima em tampão 4.8 (acetato, 0.1 M). Usaram-se concentrações iniciais de enzima entre 0.003 e 0.100 g/l de celulase. Os ensaios foram efectuados a 50°C e depois de 60 minutos retirou-se uma amostra do banho para determinação dos açúcares redutores totais e cálculo posterior da velocidade inicial. Os ensaios foram efectuados nos copos reactores de 500 ml do Linitest (Original Hanau) com *baixa fricção mecânica* (BFM) a 65 rpm. Os ensaios com *alta fricção mecânica* (AFM) são iguais a BFM, mas é conseguido juntando no copo reactor 10 discos de aço usados na solidez a lavagem a seco.

#### **2.3.8- Misturas de CBH I e EG I da *Trichoderma reesei***

As misturas foram feitas em tampão 4.8 (acetato, 0.1 M) baseadas na concentração total de 0.1 mg/ml de proteína. Misturou-se CBH I com EG I nas composições de 100, 80, 70, 60, 40 e 0 %. Por ensaio usaram-se 9 g de tecido de popelina para 100 ml de solução de enzima em tampão. O tratamento foi efectuado a 50°C e durou 60 minutos. Os tecidos e fibras foram lavados com carbonato de sódio a 10 % e posteriormente em água fria e quente. Os tratamentos foram efectuados nos copos reactores de 500 ml do Linitest (Original Hanau) com *baixa fricção mecânica* (BFM) a 65 rpm. O tratamento com *alta fricção mecânica* (AFM) é igual ao BFM, mas é conseguido juntando no copo reactor 10 discos de aço usados na solidez a lavagem a seco.

### **2.4- Testes de Controle dos Tratamentos Enzimáticos**

#### **2.4.1- Perda de Peso**

A perda de peso (PP) é determinada por pesagem das amostras antes e depois do tratamento, em ambiente condicionado de 20°C e a 65 % de humidade relativa. A variação de peso final é corrigida pela variação de peso numa amostra de controle tratada nas mesmas condições das outras, mas apenas com tampão. Esta correcção é feita devido a pequenas variações ambientais na sala de condicionamento (STULZ COMPTRON 1001). O resultado final é a média da quantidade de tratamentos repetidos.

#### **2.4.2- Comprimento Médio dos Açúcares Hidrolisados**

O comprimento médio dos açúcares hidrolisados (CMAH) é calculado pela seguinte expressão:

$$CMAH = (PP.M)/(rs.V.0,9)$$

onde *PP* é a perda de peso, *M* é a massa seca inicial de amostra, *rs* é a concentração de açúcares redutores totais no banho de tratamento, *V* é o volume total do banho de tratamento e *0.9* é o factor de correcção da massa de glicose para o monómero da celulose.

#### **2.4.3- Poder Redutor de Algodão**

O poder redutor das fibras de algodão (grupos terminais redutores no algodão) é determinado de seguinte maneira: pesam-se 100 ± 1 mg de amostra, adicionam-se 5 ml de reagente de neocuproína/cobre e 2 ml de carbonato de sódio 2 %. Incuba-se depois 5 minutos em banho de água a ferver e juntam-se 10 ml de água e lê-se a densidade óptica a 475 nm contra um branco com ambos os reagentes. Usa-se a mesma curva de calibração utilizada para os açúcares redutores totais. O poder redutor do algodão (PRA) é dado em mg de glicose por grama de celulose.

$$PRA = (rs.0,05)/(0,1.h)$$

em que *rs* é o valor lido da concentração de açúcares redutores formados, *h* é o teor de humidade da amostra e 0.05 e 0.1 são factores de conversão. Para cada amostra são realizados três ensaios.

#### **2.4.4- Fluidez de Soluções de Celulose em Cuproetilenodiamina**

Adicionaram-se 20.0 ± 0.1 mg de amostra finamente dividida a 25 ml de água. Juntaram-se 0.5 g de aparas de cobre e agitou-se durante 5 minutos. Juntou-se 25 ml solução de cuproetilenodiamina (Carlo Erba, pa, 1 M em Cu (II)) e borbulhou-se a mistura com azoto (Ar Líquido) durante 30 segundos. Agitou-se a mistura durante 2 horas, em ambiente padronizado de 20°C e de 65 % de humidade relativa (STULZ COMPTRON 1001) e medindo-se o tempo de escoamento num viscosímetro Schott Mainz - Jena Glass 0C app nr.7605. A fluidez é o inverso da viscosidade específica, que por sua vez é calculada pela razão da

diferença dos tempos de escoamento entre a solução e solvente sobre o solvente. Para cada amostra são realizados três ensaios. (Teste adaptado da norma UNE 57039 (CITEVE)).

#### 2.4.5- Índice de Cristalinidade Medido por Difracção de Raios X

Os difractogramas de Raios X foram obtidos num espectrómetro Philips Analytical PW 1710 com um tubo de raios X de radiação Ni, filtrada por CuK $\alpha$ . Os limites do difractograma são 10° e 30°. O índice de cristalinidade calculou-se usando o método de Chidambareswaran *et al* (76) como referido no capítulo II.5.1.

#### 2.4.6- Perda da Força de Rotura

Este teste foi realizado num Instron, modelo 4204. Mediu-se a força de rotura a seco para uma distância inicial de 15 cm entre as garras que seguram toda a largura do provete. As dimensões dos provetes utilizados foram de 20 cm (direcção da teia) por 3 cm (direcção da trama). Antes do ensaio, os provetes foram condicionados 24 horas a 20°C e a 65% de humidade relativa. A velocidade constante, para todos os ensaios, foi de 100 mm por minuto. Todos os ensaios também se realizaram nesta atmosfera padrão. Foram utilizados seis provetes para cada amostra e a perda da força de rotura foi calculada relativamente à amostra controlo tratada nas mesmas condições, mas só com tampão.

#### 2.4.7- Parâmetros das Fibras de Algodão

Os parâmetros das fibras de algodão foram obtidos, após condicionamento das amostras durante 24 horas a 20°C e a 65% de humidade relativa, no *High Volume Instrument for testing cotton fibres* (HVI 4000, Siegfried Peyer AG). Os parâmetros medidos foram Micronaire, Comprimento Médio das Fibras, Índice de Uniformidade, Conteúdo em Fibras Curtas e Resistência (Manual do HVI 4000, Siegfried Peyer AG, 1990, Suíça). Para cada determinação fez-se a média dos valores obtidos para as amostras relativas aos três tratamentos repetidos.

#### 2.4.8- Grau de "Pilling"

O grau de "pilling" nos tecidos foi medido de acordo com a norma ASTM 3512 do Atlas Random Pilling Tester. O grau de propensão ao "pilling" num tecido é classificado numa escala de 1 a 5 por comparação com padrões: 1 - maior propensão ao "pilling" e 5 - tecido sem propensão ao "pilling".

#### 2.4.9- Absortividade Térmica

A absortividade térmica foi medida no Alambeta (Zbrojovka Brno, Nisa, Rep. Checa), tendo-se calculado para cada amostra a média de dez determinações.

#### 2.4.10- Propriedades Mecânicas dos Tecidos

As propriedades mecânicas foram medidas nos módulos do KES-F (Kawabata Evaluation System for Fabrics). Para cada amostra efectuaram-se testes na extremidade inferior e superior de cada direcção para os ensaios de tracção, flexão e corte. Para os restantes ensaios testou-se o mesmo tecido duas vezes em sítios diferentes. As dimensões dos provetes ensaiados são 20 por 20 cm. Todos os módulos usados são da Kato Tech. Co, Ltd. Na tabela III.4 estão descritos todos os parâmetros mecânicos do sistema KES (81).

TABELA III.4 - Parâmetros Mecânicos do Sistema KES			
Propriedades	Ref.	Parâmetros Mecânicos	Unidade
Tracção (KES - FB1)	LT	Linearidade da curva carga-alongamento	-
	WT	Energia de tracção por unidade de área	gf.cm/cm <sup>2</sup>
	RT	Resiliência à tracção	%
	EMT	Extensibilidade à tracção de 500 gf/cm	%
Flexão (KES - FB2)	B	Módulo da resistência à flexão	gf.cm <sup>2</sup> /cm
	2HB	Histerese do movimento de flexão	gf.cm <sup>2</sup> /cm
Corte (KES - FB1)	G	Módulo da resistência ao corte	gf.cm.degree
	2HG	Histerese da tensão de corte a $\theta = 0.5^\circ$	gf.cm
	2HG5	Histerese da tensão de corte a $\theta = 5^\circ$	gf.cm
Compressão (KES - FB3)	LC	Linearidade da curva compressão-espessura	-
	WC	Energia de compressão por unidade de área	gf.cm/cm <sup>2</sup>
	RC	Resiliência à compressão	%
Superfície (KES - FB4)	MIU	Coefficiente de atrito	-
	MMD	Desvio padrão do coeficiente de atrito	-
	SMD	Rugosidade geométrica	micron
Construção do tecido a)	W	Massa por unidade de área	mg/cm <sup>2</sup>
	To	Espessura a 0,5 gf/cm <sup>2</sup>	mm
	Tm	Espessura a 50 gf/cm <sup>2</sup>	mm

a)- massa por unidade de área é substituída no tratamento dos dados pela perda de peso (PP) dos tecidos, pois é sua função.

To e Tm são determinadas no modulo KES - FB3. To foi determinada a 2.5 gf/cm<sup>2</sup>.

### 2.4.11- Microscopia Electrónica de Varrimento

As fibras foram cobertas com uma camada de ouro, durante dois minutos, no Metalizador Bio-Rad SC502. As fotografias das amostras metalizadas foram obtidas no microscópio de reflexão Leica Cambridge Stereoscan 360.

### 2.4.12- Microscopia Electrónica de Varrimento de Alta Pressão

Durante a secagem das fibras de algodão tratadas como descrito em III.2.3.4., gravou-se uma fita de vídeo. A secagem das fibras foi conseguida por abaixamento da pressão do compartimento de amostras de 6 Torr para 2.5 Torr no Microscópio Electrónico de Varrimento (Reflexão) Electron Scan, Mod. 3.

## 2.5- Tratamento de Dados

### 2.5.1- Cálculo de Erros e Expressão de Resultados

Para cada série de medidas foram determinados média, desvio padrão e erro padrão da média (89).

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \text{média}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{X} - X_i)^2}{n-1}} \quad \text{desvio padrão}$$

$$\sigma_m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad \text{erro padrão da média}$$

em que  $n$  é o efectivo da amostra e  $X_i$  é o valor da variável. O resultado final pode ser expresso na forma de

$$\bar{X} \pm \sigma_m$$

dando este resultado a precisão de um determinado conjunto de medidas efectuadas (89). No entanto, como nesta tese o número de medidas efectuadas para o cálculo de cada um dos parâmetros é relativamente baixo ( $n < 30$ ) não se pode assumir que a distribuição dos dados seja normal. Neste caso, com um efectivo pequeno é mais correcto admitir que os erros seguem a lei de Student (89). Então o resultado é mais correctamente expresso por:

$$\bar{X} \pm \sigma_m \cdot t$$

em que  $t$  é um valor obtido das tabelas de Fisher, que se pode encontrar em qualquer livro de estatística ou de tratamento de dados (89). No presente trabalho usou-se o valor de  $t$  para uma probabilidade de 95%.

Considerando um dado número de grandezas medidas com valores médios  $\bar{X}_1, \bar{X}_2, \dots, \bar{X}_n$ , e erros  $E_1, E_2, \dots, E_n$ , respectivamente, o erro padrão das grandezas de uma função de  $X_1, X_2, \dots, X_n$ , com média  $f(\bar{X}_1, \bar{X}_2, \dots, \bar{X}_n)$  é o valor  $E$  dado por:

$$E = \left( \frac{\delta f}{\delta X_1} \right)^2 \cdot E_1^2 + \left( \frac{\delta f}{\delta X_2} \right)^2 \cdot E_2^2 + \dots + \left( \frac{\delta f}{\delta X_n} \right)^2 \cdot E_n^2$$

No presente trabalho, os resultados são apresentados apenas na forma de tabela ou em forma gráfica. Nas tabelas, os valores apresentam o número de algarismos necessários de modo que só o último algarismo (à direita) tenha erro associado. Nos gráficos, os valores representados têm o erro associado ao último algarismo (à direita) do valor apresentado na legenda do respectivo eixo. As excepções são os casos dos parâmetros cinéticos e de adsorção, que são apresentados na forma de tabela com os erros associados e na forma de diagrama com os valores médios calculados.

### 2.5.2- Regressão Linear e Não Linear

A determinação dos parâmetros numa recta a partir de dados experimentais foi feita com o programa SPSS 6.0 for Windows e o erro associado aos parâmetros estimados foi determinado a um nível de 95% de confiança (90).

Nas experiências de cinética e de adsorção, as curvas de regressão, bem como os respectivos parâmetros, foram calculados por regressão não linear com o programa SPSS 6.0 for Windows e o erro associado aos parâmetros estimados é determinado a um nível de 95% de confiança (90). Na regressão não linear, os valores dos parâmetros são estimados por um processo iterativo em que o valor inicial para cada parâmetro foi sempre 1.

### **2.5.3- Mapas de Vectores**

Os dados dos mapas de vectores foram obtidos por análise de componentes principais (SPSS 6.0 for Windows (90), Statistics, Data Reduction) aplicados aos dados dos parâmetros mecânicos e do grau de *pillling*. As coordenadas dos vectores são os "factors scores coefficients" para cada um dos parâmetros e as coordenadas de cada amostra no novo espaço são os respectivos "factors scores". O grau de correlação entre os dados de dois parâmetros é avaliado pela projecção dos respectivos vectores entre si. O valor dum parâmetro de cada amostra é dado pela sua projecção no respectivo vector parâmetro. Um mapa de vectores permite, assim, visualizar as inter-relações entre os vários parâmetros mecânicos e valores relativos das características de cada tecido usado na análise. Esta técnica foi descrita por Bishop e Cox (87) (Ver a aplicação desta técnica em IV.3).

## IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1- ACTIVIDADE ENZIMÁTICA

A actividade das celulasas usadas neste trabalho foi medida em diferentes substratos (tab. IV.1). Mediu-se a actividade em celobiose, em derivado da celulose solúvel (CMC), em celulose amorfa (CAIAF) e em celulose do algodão com meia branqueação. Pretende-se relacionar os valores das actividades, medidas nos diferentes substratos, com a possível actividade/composição preferencial das misturas celulolíticas usadas.

Enzima \ Substrato	Celobiose	CMC	CAIAF	Algodão
Cellusoft L	0,8 (U/g)	159 (U/g)	361 (U/g)	1,3 (%)
Denimax T	0,9 (U/g)	115 (U/g)	144 (U/g)	0,9 (%)
SP492-PPC3617 (EG)	0 (U/g)	73 (U/g)	28 (U/g)	0 (%)
CE 883042 (CT)	2,2 (U/g)	94 (U/g)	194 (U/g)	1,4 (%)
CE 519/92 (C-EG I & II)	4,7 (U/g)	120 (U/g)	275 (U/g)	1,1 (%)
CE 523/92 (C-CBH I & II)	4,4 (U/g)	159 (U/g)	93 (U/g)	0,5 (%)

Nota: Ver a metodologia em III.2.2, U/g - unidade por grama de produto fornecido

A Cellusoft L tem maior actividade que a Denimax T em todos os substratos. No entanto, a Denimax T possui uma maior actividade relativa em CMC, contendo preferencialmente uma maior actividade "endo". Ambos estes produtos comerciais têm uma actividade muito baixa em celobiose, possivelmente porque se pretende que a acção hidrolítica das celulasas seja limitada, nos tecidos de algodão (29, 30, 31).

A celulase SP492-PPC3617 confirmou ser uma endoglucanase por possuir a maior actividade relativa em CMC. Este produto poderá ser uma EG (ou mistura de EGs) sem CBD, por não apresentar actividade em celulose cristalina (49).

A maior actividade relativa de C - EG I & II e de C - CBH I & II em CAIAF e em CMC, confirma a esperada maior actividade "exo" e "endo", respectivamente. O apagamento das actividades de EG I & II ou de CBH I & II vai aumentar para o dobro a actividade em celobiose, porque a percentagem em celobiose aumenta na composição do crude celulolítico.

Quando se comparam os resultados das actividades de todas as celulasas, verifica-se que a maior actividade em CMC ou em CAIAF não corresponde a uma maior actividade no algodão, medida como perda de peso. Esta aparente contradição indica que é necessário ter cuidado na previsão das actividades celulolíticas no algodão, apenas com base nos resultados de actividade sobre os derivados da celulose ou celulose amorfa.

A actividade das celulasas purificadas não foi medida, neste trabalho, por já se encontrar descrita na literatura (8, 37, 38, 45). Ambas EG I e CBH I de *T.reesei* foram purificadas segundo metodologia descrita na literatura (37, 38).

### 2- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA

Elaboram-se uma série de ensaios com celulasas comerciais numa gama de concentrações de enzima (0.1-2% em relação ao peso de fibra) semelhante ao usado na indústria. Os tratamentos foram efectuados no Linitest, com dois níveis de acção mecânica, tal como descrito em II.2.3.1. Pretendeu-se diferenciar a acção de ambas as enzimas (Cellusoft L e Denimax T) nos dois níveis de fricção mecânica usados sobre os quatros substratos (feixe de fibras e três tecidos: popelina, popelina mercerizada e flanela).

#### 2.1- Açúcares Redutores Totais e Aplicação do Modelo Cinético

Para a aplicação do modelo cinético descrito em II.3.2, considera-se que, para diferentes concentrações de enzima, a velocidade inicial é medida, pelo valor da concentração de açúcares redutores totais ao fim de uma hora no banho de tratamento.

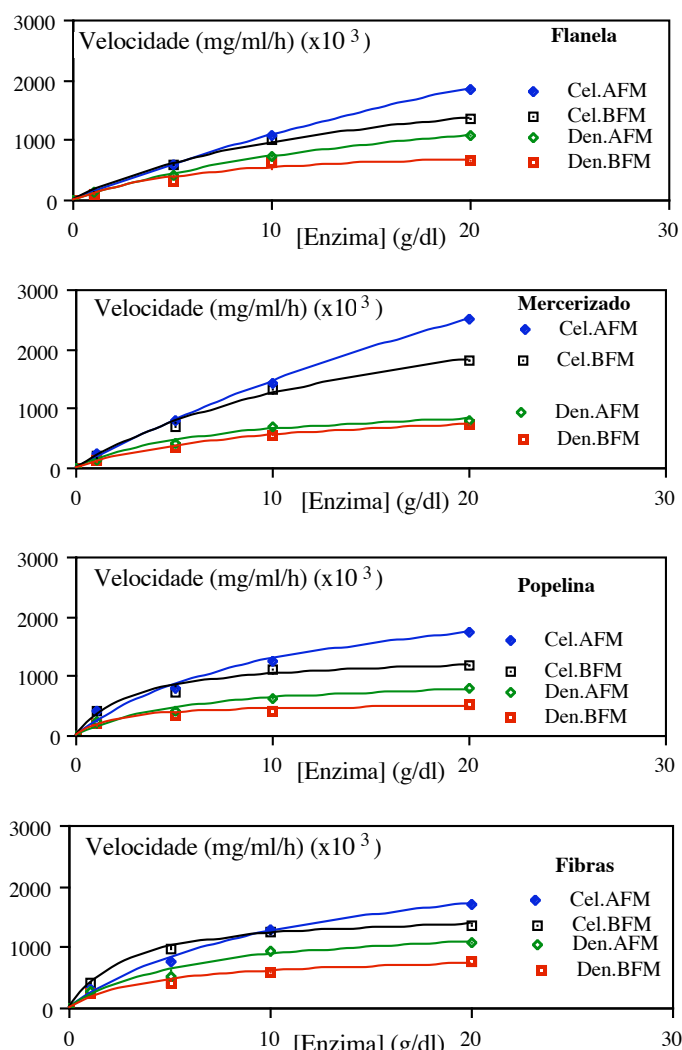


Figura IV.1- Relação entre velocidade de reacção e concentração de enzima. As linhas nos diagramas foram obtidas por regressão não linear. Cel.-Cellusoft L, Den.-Denimax T, BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

TABELA IV.2 - Parâmetros Cinéticos Calculados			
Processo	Vmax(mg/ml/h)	Ke(mg/ml)	Vmax/Ke(1/h)
Flanela			
Cel.BFM	2,4 ± 0,2	1,5 ± 0,3	1,6 ± 0,4
Cel.AFM	6,9 ± 0,9	5,4 ± 0,9	1,4 ± 0,3
Den.BFM	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,3	1,3 ± 0,6
Den.AFM	2,2 ± 0,1	2,0 ± 0,2	1,1 ± 0,1
Mercerizado			
Cel.BFM	3,4 ± 0,4	1,7 ± 0,4	2,0 ± 0,5
Cel.AFM	8,9 ± 1,7	5,1 ± 1,3	1,7 ± 0,6
Den.BFM	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,2
Den.AFM	1,1 ± 0,1	0,7 ± 0,2	1,6 ± 0,5
Popelina			
Cel.BFM	1,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	4,3 ± 1,5
Cel.AFM	2,6 ± 0,5	1,0 ± 0,4	2,6 ± 1,2
Den.BFM	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,1	2,5 ± 1,3
Den.AFM	1,0 ± 0,2	0,5 ± 0,3	2,0 ± 1,3
Fibras			
Cel.BFM	1,6 ± 0,1	0,3 ± 0,1	5,3 ± 1,8
Cel.AFM	2,7 ± 0,3	1,1 ± 0,3	2,5 ± 0,7
Den.BFM	0,9 ± 0,1	0,5 ± 0,2	1,8 ± 0,8
Den.AFM	1,4 ± 0,2	0,6 ± 0,2	2,3 ± 0,9

Cel.-Cellusoft L, Den.-Denimax T, BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.



A figura IV.1 mostra a relação entre a velocidade de reacção e a concentração de enzima. As linhas representadas nos diagramas foram obtidas por "regressão não linear" e os parâmetros cinéticos calculados estão descritos na tabela IV.2.

A velocidade máxima de saturação do substrato está representada na figura IV.2, para ambos os processos AFM e BFM e para todos os substratos. Pode-se confirmar, pelo maior valor de  $V_{max}$ , a maior actividade no algodão de Cellusoft L relativamente à Denimax T. A fricção mecânica aumenta a velocidade da reacção, de um modo mais significativo para os tecidos do que para as fibras. Geralmente,  $V_{max}$  é maior no tecido mercerizado e menor na popelina.  $V_{max}$  nas fibras é ligeiramente superior ao valor encontrado para a popelina.

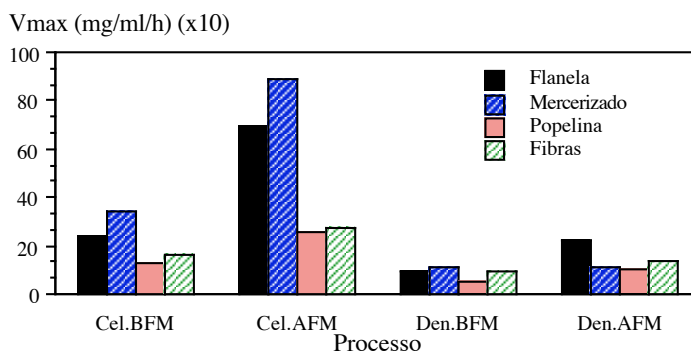


Figura IV.2- Velocidade máxima para todos os tratamentos e substratos. Cel.-Cellusoft L, Den.-Denimax T, BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

As observações relativamente aos valores de  $V_{max}$  devem-se, muito possivelmente, aos seguintes factores:

- i) As fibras de celulose, num feixe de fibras, estão mais acessíveis ao ataque enzimático do que num tecido.
- ii) No entanto, as fibras num tecido estão mais sujeitas a uma maior fricção mecânica fibra-metal (discos do Linitest) do que as fibras num feixe.
- iii) A celulose da pelagem produzida por cardação mecânica é mais acessível ao ataque enzimático do que as outras fibras no tecido e, além disso, a superfície das fibras da pelagem é, muito possivelmente, mais desfibrilada e, por isso mais acessível do que as outras fibras.
- iv) A celulose dos tecidos mercerizados é mais acessível às celulases do que a celulose não mercerizada, como já foi referido no capítulo II.1.5 e II.4.2.

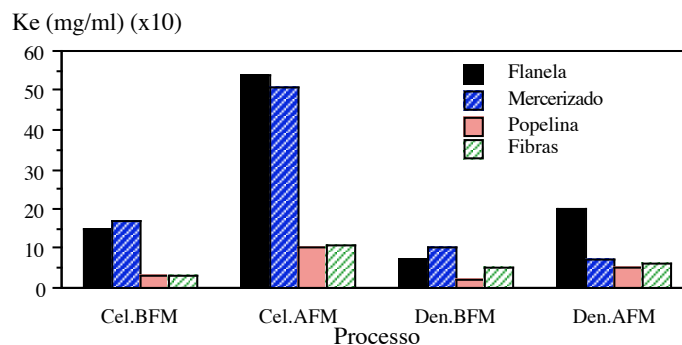


Figura IV.3- Constante de meia saturação para todos os tratamentos e substratos. Cel.-Cellusoft L, Den.-Denimax T, BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

A constante de meia saturação ( $K_e$ ) pode ser interpretada como uma constante aparente de dissociação de todas as espécies ligadas à enzima, significando que o complexo celulolítico de Denimax T tem mais tendência a ligar-se à celulose do que o complexo de Cellusoft L (fig. IV.3). O aumento da fricção mecânica pelos discos nos copos do Linitest aumenta a dissociação de todas as espécies ligadas às celulases. A dissociação é também superior para a popelina mercerizada e para a flanela, por estas terem uma celulose mais acessível e a hidrólise ser mais rápida, havendo consequentemente, mais enzima disponível para a catálise, na forma não associada.

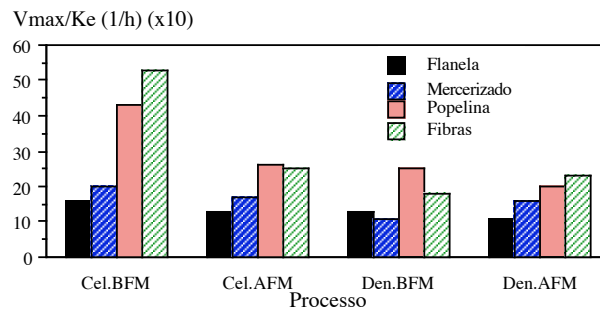


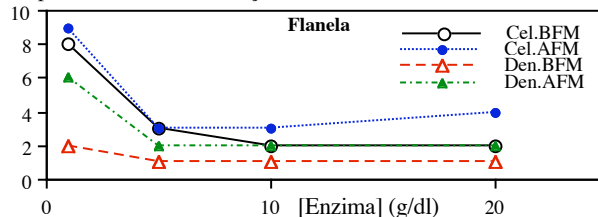
Figura IV.4- Especificidade catalítica para todos os tratamentos e substratos. Cel.-Cellusoft L, Den.-Denimax T, BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

A celulase Denimax T tem menor especificidade catalítica que a Cellusoft L, confirmando assim a sua maior actividade "endo" (fig. IV.4). A actividade "endo", de cisão aleatória, é provavelmente menos específica que a actividade "exo", nas extremidades das cadeias de celulose. A fricção mecânica parece diminuir a eficiência catalítica, embora as diferenças não sejam significativas (a maior parte dos valores calculados têm associados limites de erro consideráveis). A especificidade catalítica parece ser menor nos substratos mais acessíveis, onde terá mais tendência em actuar a actividade "endo".

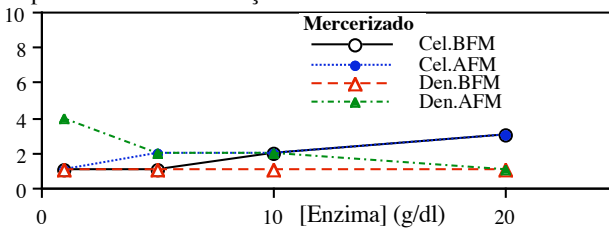
## 2.2- Comprimento Médio dos Açúcares Hidrolisados

O comprimento dos açúcares no líquido de tratamento é geralmente maior para o feixe de fibras e para a flanela (fig. IV.5). Nestes substratos verifica-se também que, para ambas as enzimas e processos, o comprimento dos açúcares hidrolisados diminui com a concentração da enzima. A celulose mais acessível na pelugem, ou no feixe de fibras, é mais facilmente removível pela celulase mais activa, Cellusoft L, na forma de pó de algodão insolúvel ( $DP > 6$ ), como se verificou no líquido de tratamento. Confirma-se que a acção mecânica é mais forte nos tecidos do que no feixe das fibras, pois na flanela o processo AFM origina sempre açúcares mais compridos, enquanto que no feixe de fibras é o processo BFM que origina açúcares maiores.

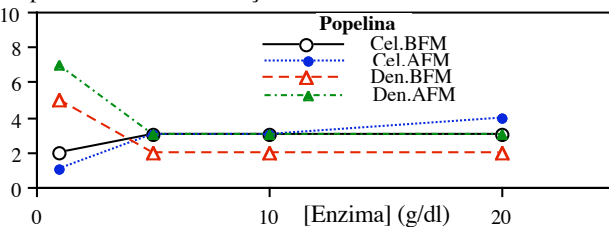
Comprimento Médio dos Açúcares Hidrolisados



Comprimento Médio dos Açúcares Hidrolisados



Comprimento Médio dos Açúcares Hidrolisados



Comprimento Médio dos Açúcares Hidrolisados

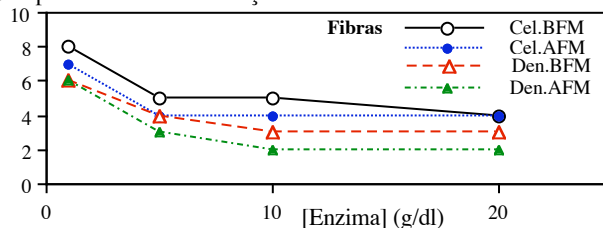


Figura IV.5- Relação entre comprimento médio dos açúcares hidrolisados e concentração de enzima. Cel.-Cellusoft L, Den.-Denimax T, BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

A celulose do tecido mercerizado mais acessível é a que, após hidrólise, origina açúcares de menor comprimento. Nas popelinas, mercerizada e não mercerizada, verifica-se que Denimax T diminui o comprimento dos açúcares hidrolisados com o aumento da concentração de enzima, enquanto que com Cellusoft L sucede o oposto. Estes factos devem-se, muito possivelmente, ao sinergismo entre os componentes de Cellusoft L a baixas concentrações (47), na hidrólise do algodão das popelinas, com uma estrutura menos acessível.

### 2.3- Poder Redutor do Algodão Tratado

O aumento das extremidades reductoras no algodão verifica-se, geralmente, com o aumento da concentração da enzima (fig. IV. 6). A celulase mais activa, Cellusoft L, e os processos com maior fricção mecânica, geralmente também aumentam o poder reductor do algodão tratado. Estas observações verificam-se para o feixe de fibras, enquanto que, de um modo geral, para os tecidos existe diminuição do poder reductor entre os dois tratamentos com maiores concentrações de enzima. Nos tratamentos de tecidos com baixas concentrações de enzima verifica-se, por vezes, a diminuição do poder reductor.

As observações gerais referidas anteriormente só se verificam nas fibras por estas terem sido fervidas apenas com alcali, sem branqueador oxidante capaz de aumentar o poder reductor. Os tecidos têm todos maior poder reductor, resultante do processo de meia branqueação efectuada previamente. As variações do poder reductor com a concentração de enzima devem-se à existência de cadeias fragmentadas à superfície das fibras (pelo processo de meia branqueação), que podem ser removidas pela acção das celulases. Este facto pode ser exemplificado pelo tecido mercerizado, com maior poder reductor inicial e com grande amplitude de variações deste parâmetro.

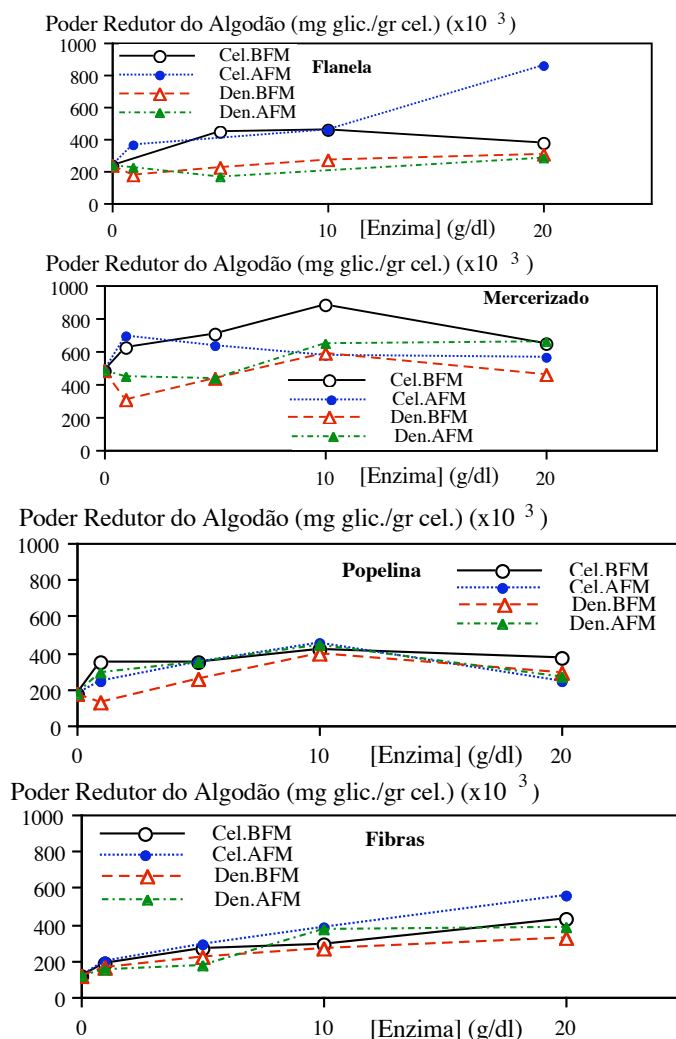


Figura IV.6- Relação entre poder reductor do algodão tratado e concentração de enzima. Cel.-Cellusoft L, Den.-Denimax T, BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

### 2.4- Perda de Força de Rotura

Em todos os tecidos (fig. IV.7), verifica-se que a celulase mais activa, Cellusoft L, origina maior perda de resistência do que Denimax T. A maior fricção mecânica no processo AFM também aumenta a perda de resistência nos tecidos tratados. A flanela apresenta maior perda de resistência do que as popelinas, muito embora se não verifiquem diferenças significativas.

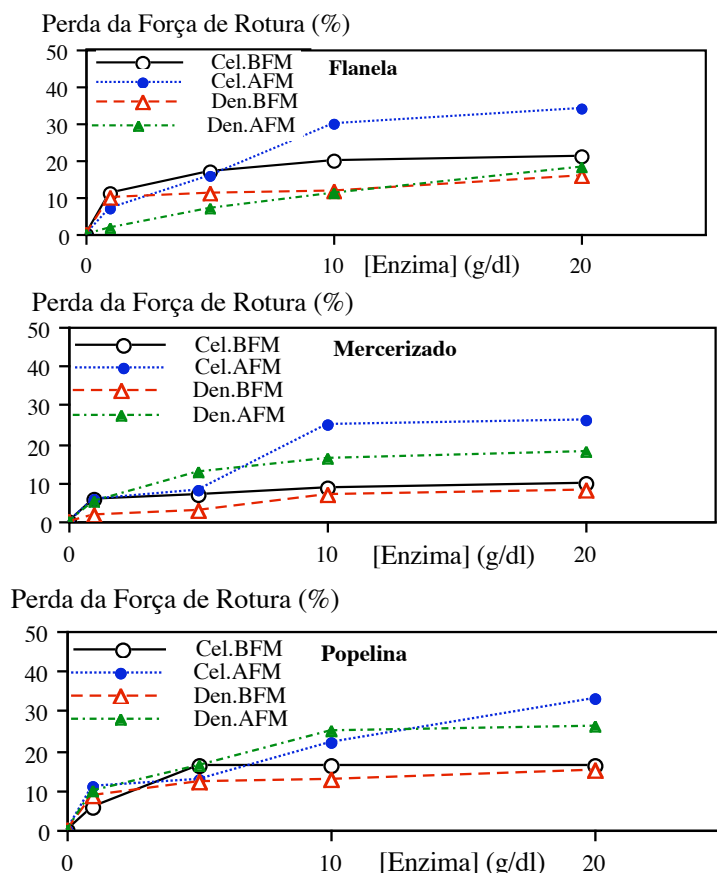


Figura IV.7- Relação entre perda da força de rotura e concentração de enzima. Cel.-Cellusoft L, Den.-Denimax T, BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

## 2.5- Parâmetros das Fibras Tratadas

Os factores verificados para a perda de resistência nos tecidos são também os observados para a variação de resistência nas fibras, isto é, nos tecidos Cellusoft L e o processo AFM produzem maior perda de resistência (fig. IV.8).

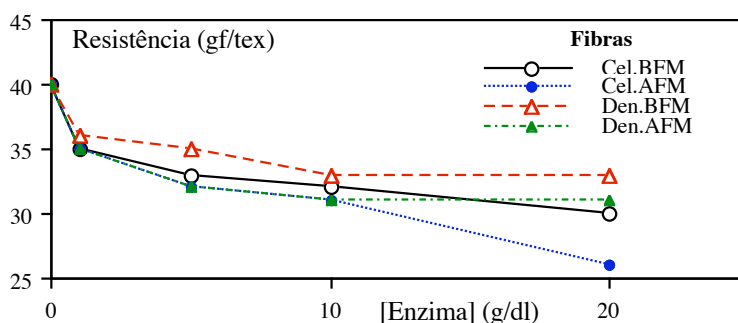


Figura IV.8- Relação entre a resistência das fibras e a concentração de enzima. Cel.-Cellusoft L, Den.-Denimax T, BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

As variações no conteúdo em fibras curtas (% de fibras com comprimento menor que 12.7 mm) e no comprimento médio das fibras dão uma ideia da capacidade do tratamento celulolítico para sectionar as fibras. Os diagramas das figuras IV.9 e IV.10, mostram que a celulase mais activa, Cellusoft L, e os processos com maior fricção mecânica, são os mais eficazes para sectionar as fibras.

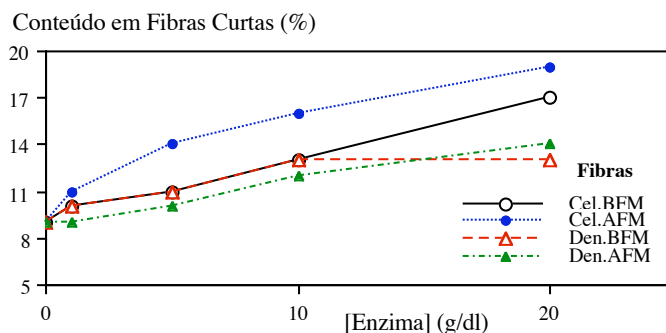


Figura IV.9- Relação entre o conteúdo em fibras curtas e a concentração de enzima. Cel.-Cellusoft L, Den.-Denimax T, BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

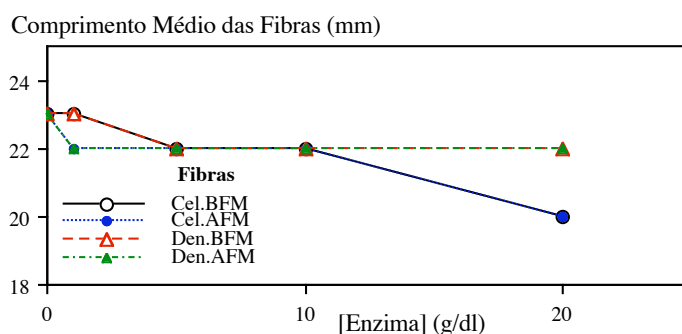


Figura IV.10- Relação entre o comprimento médio das fibras e a concentração de enzima. Cel.-Cellusoft L, Den.-Denimax T, BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

### 2.8- Grau de "Pilling"

As popelinas não tem propensão à produção de "pilling", como pode ser observado na figura IV.11. A capacidade de seccionar as fibras, observada no ponto anterior, é aqui confirmada pela capacidade de seccionar a pelugem à superfície do tecido cardado, pela Cellusoft L e pelo processo AFM, apesar de se estar em presença de dois substratos diferentes .

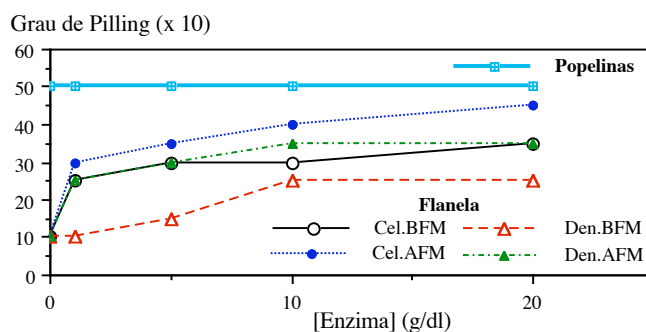


Figura IV.11- Relação entre o grau de Pilling e a concentração de enzima. Cel.-Cellusoft L, Den.-Denimax T, BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

## 3- ANÁLISE MULTIVARIADA DOS PARÂMETROS DOS TECIDOS TRATADOS COM CELULASES

Os valores numéricos dos parâmetros dos tecidos tratados com celulases estão compilados nas tabelas IV.3, IV.4 e IV.5 para a popelina, a popelina mercerizada e a flanela respectivamente. Estes tecidos foram tratados com diferentes concentrações de Cellusoft L e Denimax T com dois níveis de acção mecânica, como descrito em III.2.3.1, tendo sido analisados anteriormente alguns dos parâmetros associados ao processamento.

Neste ponto faz-se uma análise dos parâmetros mecânicos dos tecidos tratados. Incluem-se ainda nestes estudos, o grau de "pilling" (propensão) bem como a absorvidade térmica.

### 3.1- Análise das Popelinas e das Flanelas Tratadas

Na primeira análise consideram-se todos os parâmetros mecânicos e todos os tecidos tratados. Excluem-se o "pilling" e a absorvidade térmica: o "pilling", por ter variância zero nas popelinas e a absorvidade térmica, por só ter sido possível ser medida nas flanelas.

O método sugerido por Bishop e Cox (87) sugere a aplicação da análise multivariada aos dados relativos à série de parâmetros mecânicos do KES-F. Como se pretende obter um mapa de vectores bidimensional, foram extraídos os dois primeiros factores. A variância total destes dois factores é de 62.6 % relativamente aos dados iniciais. A variância não é distribuída de igual modo pelos dois factores, devido à diferença das propriedades entre as popelinas e a flanela.

Na tabela IV.6 estão registadas as variâncias para cada um dos parâmetros, após a extracção dos dois primeiros factores. Os parâmetros com maior variância são os que apresentam maiores diferenças entre as popelinas e a flanela. As maiores variâncias (> 90%) estão associadas aos parâmetros de corte e às espessuras. A perda de peso (PP) que mede a extensão do tratamento enzimático, apresenta variância baixa, pois as perdas de peso dos três tecidos são valores dentro da mesma gama ( $\approx$  0-4/6 %).

Na figura IV.12 está representado o mapa de vectores para os três tecidos tratados com celulases. A análise dos diagramas de vectores é feita com base nas posições relativas dos vectores e com base nas posições relativas dos tecidos no mapa.

TABELA IV.3 - Parâmetros dos Tecidos Tratados - Popelina										
Referência	PP	LT	WT	RT	EMT	B	2HB	G	2HG	2HG5
Popelina	0,0	0,67	10,4	64	6,2	0,046	0,062	1,15	2,90	4,90
Cel.BFM 0.1	0,2	0,69	12,1	71	7,0	0,045	0,056	1,12	2,40	5,25
Cel.BFM 0.5	0,9	0,66	12,1	71	7,3	0,043	0,055	1,12	2,60	5,55
Cel.BFM 1	1,3	0,64	11,7	71	7,3	0,040	0,055	1,17	3,00	5,15
Cel.BFM 2	2,0	0,65	12,8	72	7,9	0,040	0,050	1,08	2,65	4,95
Cel.AFM 0.1	0,1	0,67	13,0	72	7,7	0,043	0,060	1,12	2,58	5,10
Cel.AFM 0.5	1,1	0,73	12,6	70	7,0	0,040	0,051	1,23	2,77	5,35
Cel.AFM 1	2,3	0,67	13,8	74	8,2	0,038	0,050	1,00	2,75	4,95
Cel.AFM 2	4,0	0,66	14,2	75	8,6	0,038	0,048	1,08	2,75	5,10
Den.BFM 0.1	0,7	0,69	13,1	67	7,2	0,045	0,059	1,12	2,90	4,90
Den.BFM 0.5	0,7	0,69	12,1	67	7,2	0,045	0,059	1,10	2,90	4,85
Den.BFM 1	0,9	0,70	14,9	69	7,3	0,043	0,058	1,10	2,80	4,80
Den.BFM 2	1,2	0,71	12,7	72	8,5	0,040	0,057	1,20	2,45	4,72
Den.AFM 0.1	0,9	0,70	15,3	69	7,1	0,045	0,062	1,23	2,95	5,25
Den.AFM 0.5	1,1	0,71	12,7	71	7,6	0,045	0,062	1,24	3,00	5,20
Den.AFM 1	1,8	0,72	14,5	72	8,3	0,045	0,063	1,26	3,05	5,70
Den.AFM 2	2,2	0,73	13,7	74	8,6	0,046	0,066	1,25	2,99	5,85
Referência	LC	WC	RC	To	Tm	MIU	MMD	SMD	"pilling"	
Popelina	0,38	0,23	54	0,44	0,28	1,63	2,19	4,8	5,0	
Cel.BFM 0.1	0,33	0,21	61	0,40	0,25	1,99	2,08	3,8	5,0	
Cel.BFM 0.5	0,34	0,19	56	0,35	0,24	1,70	2,15	4,8	5,0	
Cel.BFM 1	0,39	0,22	54	0,37	0,24	1,70	2,38	3,9	5,0	
Cel.BFM 2	0,40	0,20	60	0,37	0,24	1,73	1,88	5,4	5,0	
Cel.AFM 0.1	0,36	0,19	60	0,40	0,24	1,73	1,44	2,4	5,0	
Cel.AFM 0.5	0,37	0,27	50	0,41	0,24	1,90	2,12	3,6	5,0	
Cel.AFM 1	0,40	0,19	58	0,37	0,24	1,85	1,69	2,4	5,0	
Cel.AFM 2	0,42	0,20	56	0,35	0,24	1,76	1,50	2,8	5,0	
Den.BFM 0.1	0,39	0,20	58	0,38	0,25	1,69	1,52	2,4	5,0	
Den.BFM 0.5	0,47	0,27	50	0,40	0,25	1,65	1,52	2,1	5,0	
Den.BFM 1	0,47	0,25	58	0,41	0,26	1,74	1,86	5,2	5,0	
Den.BFM 2	0,58	0,19	54	0,37	0,25	1,75	1,98	3,0	5,0	
Den.AFM 0.1	0,41	0,25	55	0,41	0,25	1,92	1,96	3,1	5,0	
Den.AFM 0.5	0,58	0,46	54	0,52	0,26	1,75	2,12	6,0	5,0	
Den.AFM 1	0,68	0,47	53	0,55	0,29	1,74	1,86	5,3	5,0	
Den.AFM 2	0,44	0,12	51	0,40	0,25	1,59	1,29	2,3	5,0	

Nota: Cel.-Cellusoft L, Den.-Denimax T, BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica. Os valores à frente das referências indicam a concentração usada de enzima (ex: Cel.AFM 1-Tecido tratado com 1% de Cellusoft L com alta fricção mecânica). As unidades dos parâmetros mecânicos estão descritas na tabela III.4.

TABELA IV.4 - Parâmetros dos Tecidos Tratados - Popelina Mercerizada										
Referência	PP	LT	WT	RT	EMT	B	2HB	G	2HG	2HG5
<i>Mercerizado</i>	0,0	0,56	8,3	57	5,9	0,064	0,062	1,12	2,10	4,90
<i>Cel.BFM 0.1</i>	0,1	0,65	9,8	68	6,0	0,060	0,060	1,15	2,20	4,65
<i>Cel.BFM 0.5</i>	0,8	0,70	9,3	65	5,3	0,061	0,051	1,15	2,50	4,75
<i>Cel.BFM 1</i>	1,5	0,69	9,6	68	5,6	0,060	0,052	1,10	2,00	4,85
<i>Cel.BFM 2</i>	3,0	0,69	9,4	67	5,5	0,060	0,049	1,00	2,10	4,30
<i>Cel.AFM 0.1</i>	0,1	0,68	10,3	67	6,0	0,052	0,052	1,02	2,50	4,30
<i>Cel.AFM 0.5</i>	1,1	0,67	10,3	67	6,1	0,052	0,050	1,02	2,10	4,40
<i>Cel.AFM 1</i>	2,7	0,69	11,1	70	6,4	0,058	0,050	0,99	1,92	4,30
<i>Cel.AFM 2</i>	3,9	0,70	10,8	70	6,2	0,055	0,045	1,02	2,10	4,35
<i>Den.BFM 0.1</i>	0,5	0,72	9,9	64	5,5	0,064	0,064	1,20	2,25	5,10
<i>Den.BFM 0.5</i>	0,4	0,71	10,2	65	5,8	0,059	0,058	1,10	2,15	4,55
<i>Den.BFM 1</i>	1,0	0,68	11,3	68	6,6	0,055	0,052	1,12	2,40	4,95
<i>Den.BFM 2</i>	1,5	0,71	10,0	67	6,0	0,061	0,051	1,14	2,05	4,60
<i>Den.AFM 0.1</i>	1,1	0,69	11,4	69	6,6	0,056	0,061	1,17	2,40	5,05
<i>Den.AFM 0.5</i>	1,3	0,73	10,7	66	5,9	0,059	0,059	1,19	2,35	5,00
<i>Den.AFM 1</i>	1,9	0,69	11,0	67	6,4	0,050	0,052	1,10	2,75	4,95
<i>Den.AFM 2</i>	1,9	0,72	17,2	72	9,5	0,058	0,049	1,00	1,95	4,75
Referência	LC	WC	RC	To	Tm	MIU	MMD	SMD	"pilling"	
<i>Mercerizado</i>	0,41	0,30	54	0,43	0,23	1,75	1,38	2,0	5,0	
<i>Cel.BFM 0.1</i>	0,43	0,19	57	0,35	0,22	1,87	1,35	2,1	5,0	
<i>Cel.BFM 0.5</i>	0,44	0,22	49	0,34	0,22	1,76	1,05	1,6	5,0	
<i>Cel.BFM 1</i>	0,40	0,16	52	0,31	0,21	1,90	2,55	5,2	5,0	
<i>Cel.BFM 2</i>	0,38	0,18	49	0,34	0,22	1,69	1,91	5,3	5,0	
<i>Cel.AFM 0.1</i>	0,38	0,21	61	0,37	0,22	1,18	1,73	3,1	5,0	
<i>Cel.AFM 0.5</i>	0,60	0,20	61	0,38	0,22	1,75	2,26	3,9	5,0	
<i>Cel.AFM 1</i>	0,32	0,16	52	0,34	0,22	1,75	1,45	1,9	5,0	
<i>Cel.AFM 2</i>	0,44	0,23	48	0,38	0,24	1,62	1,02	3,5	5,0	
<i>Den.BFM 0.1</i>	0,42	0,21	48	0,34	0,22	1,78	1,40	2,2	5,0	
<i>Den.BFM 0.5</i>	0,40	0,22	52	0,36	0,23	1,75	1,72	2,9	5,0	
<i>Den.BFM 1</i>	0,44	0,22	52	0,35	0,23	1,66	1,88	5,6	5,0	
<i>Den.BFM 2</i>	0,40	0,18	54	0,33	0,22	1,70	1,38	2,1	5,0	
<i>Den.AFM 0.1</i>	0,36	0,21	58	0,38	0,23	1,66	1,51	2,7	5,0	
<i>Den.AFM 0.5</i>	0,45	0,36	48	0,47	0,25	1,77	1,90	3,3	5,0	
<i>Den.AFM 1</i>	0,45	0,22	41	0,35	0,23	1,75	1,96	3,8	5,0	
<i>Den.AFM 2</i>	0,40	0,23	50	0,38	0,23	1,70	1,14	2,2	5,0	

Nota: Cel.-Cellusoft L, Den.-Denimax T, BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica. Os valores à frente das referências indicam a concentração usada de enzima (ex: Cel.AFM 1-Tecido tratado com 1% de Cellusoft L com alta fricção mecânica). As unidades dos parâmetros mecânicos estão descritas na tabela III.4.

TABELA IV.5 - Parâmetros dos Tecidos Tratados -Flanela										
Referência	PP	LT	WT	RT	EMT	B	2HB	G	2HG	2HG5
<i>Flanela</i>	0,0	0,76	15,9	70	8,3	0,046	0,051	0,57	1,35	2,10
<i>Cel.BFM 0.1</i>	0,9	0,74	17,1	72	9,3	0,040	0,047	0,52	0,88	1,65
<i>Cel.BFM 0.5</i>	1,5	0,69	16,4	70	9,6	0,041	0,046	0,47	0,75	1,55
<i>Cel.BFM 1</i>	1,9	0,63	15,9	70	10,1	0,046	0,044	0,43	0,65	1,55
<i>Cel.BFM 2</i>	3,1	0,68	13,4	65	7,9	0,047	0,044	0,45	0,95	1,55

<i>Cel.AFM 0.1</i>	0,7	0,73	16,5	71	9,2	0,041	0,044	0,45	0,77	1,52
<i>Cel.AFM 0.5</i>	1,4	0,71	13,8	66	7,6	0,041	0,043	0,38	0,70	1,40
<i>Cel.AFM 1</i>	2,7	0,68	16,6	70	9,4	0,036	0,041	0,50	0,80	1,65
<i>Cel.AFM 2</i>	6,5	0,73	13,7	64	8,0	0,039	0,034	0,43	0,88	1,50
<i>Den.BFM 0.1</i>	0,4	0,74	12,7	64	7,0	0,046	0,052	0,43	0,60	1,35
<i>Den.BFM 0.5</i>	0,7	0,73	16,5	69	9,3	0,047	0,051	0,47	0,80	1,70
<i>Den.BFM 1</i>	1,0	0,71	16,5	72	8,9	0,047	0,051	0,45	0,85	1,80
<i>Den.BFM 2</i>	1,0	0,70	18,2	73	10,4	0,047	0,049	0,45	0,80	1,60
<i>Den.AFM 0.1</i>	1,3	0,75	15,8	70	8,5	0,046	0,051	0,47	0,95	1,80
<i>Den.AFM 0.5</i>	1,5	0,75	19,2	74	10,2	0,047	0,051	0,68	1,00	1,75
<i>Den.AFM 1</i>	2,0	0,73	14,7	67	8,3	0,048	0,054	0,50	1,10	1,80
<i>Den.AFM 2</i>	3,5	0,71	16,4	70	9,0	0,050	0,054	0,65	1,70	2,60
Referência	LC	WC	RC	To	Tm	MIU	MMD	SMD	AT	"pilling"
<i>Flanela</i>	0,39	0,50	56	1,00	0,69	2,10	1,90	5,3	83	1,0
<i>Cel.BFM 0.1</i>	0,57	0,63	47	1,00	0,69	2,15	2,23	16,7	-	2,5
<i>Cel.BFM 0.5</i>	0,50	0,54	49	0,98	0,67	2,41	3,15	14,7	-	3,0
<i>Cel.BFM 1</i>	0,49	0,61	51	0,96	0,66	2,10	1,94	17,4	92	3,0
<i>Cel.BFM 2</i>	0,47	0,52	50	0,96	0,65	1,91	2,18	8,9	-	3,5
<i>Cel.AFM 0.1</i>	0,42	0,62	51	1,00	0,65	1,99	1,91	16,6	-	3,0
<i>Cel.AFM 0.5</i>	0,41	0,51	50	0,96	0,66	2,16	2,46	15,4	-	3,5
<i>Cel.AFM 1</i>	0,39	0,50	50	0,94	0,64	2,03	2,00	17,2	96	4,0
<i>Cel.AFM 2</i>	0,41	0,40	50	0,84	0,61	2,15	2,06	18,0	-	4,5
<i>Den.BFM 0.1</i>	0,44	0,62	53	1,00	0,69	2,04	1,27	11,0	-	1,0
<i>Den.BFM 0.5</i>	0,36	0,49	51	1,00	0,67	1,97	2,04	9,5	-	1,5
<i>Den.BFM 1</i>	0,45	0,54	47	0,98	0,67	1,62	1,86	9,8	73	2,5
<i>Den.BFM 2</i>	0,40	0,55	52	0,98	0,67	2,01	1,35	7,3	-	2,5
<i>Den.AFM 0.1</i>	0,43	0,49	52	1,00	0,69	2,00	1,89	9,9	-	2,5
<i>Den.AFM 0.5</i>	0,42	0,39	51	0,98	0,67	2,03	1,68	11,7	-	3,0
<i>Den.AFM 1</i>	0,44	0,50	55	0,97	0,67	2,30	2,38	11,1	60	3,5
<i>Den.AFM 2</i>	0,42	0,57	55	0,96	0,65	2,17	1,77	16,9	-	3,5

Nota: Cel.-Cellusoft L, Den.-Denimax T, BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica. Os valores à frente das referências indicam a concentração usada de enzima (ex: Cel.AFM 1-Tecido tratado com 1% de Cellusoft L com alta fricção mecânica). As unidades dos parâmetros mecânicos estão descritas na tabela III.4.

AT- absorvidade térmica ( $Wm^{-2}s^{1/2}k^{-1}$ ).

<b>TABELA IV.6 - Variância (%) dos Parâmetros Mecânicos Após Extração dos Dois Primeiros Factores (Variância Total = 62,6 %, 51 Tecidos)</b>			
Parâmetro	% Variância	Parâmetro	% Variância
B	67	MMD	15
EMT	87	RC	25
G	94	RT	77
2HB	45	SMD	83
2HG	91	To	94
2HG5	95	Tm	95
LC	6	WC	81
LT	18	WT	87
MIU	61	PP	7



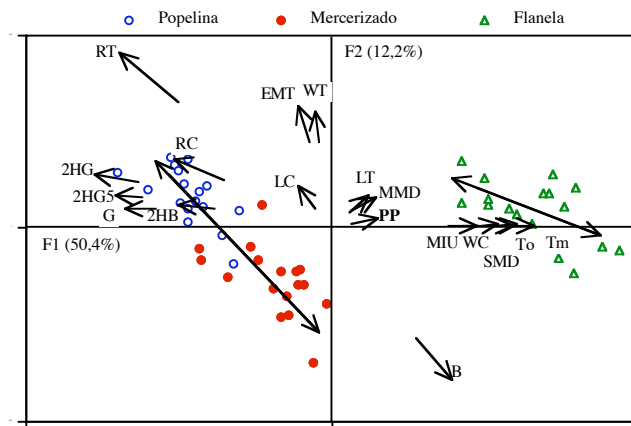


Figura IV.12- Diagrama de vectores para os factores 1 e 2 (F1/F2). A distribuição das amostras no diagrama para cada tipo de tecido (popelina, popelina mercerizada e flanela) está representada por uma dupla seta.

Podem-se distinguir três grupos, em que os parâmetros então positivamente correlacionados entre si (fig. IV.12):

Grupo 1: G, 2HG, 2HG5 e 2HB

Grupo 2: T50, T2,5, SMD WC e MIU

Grupo 3: EMT e WT

O grupo 1 de parâmetros está negativamente correlacionado com os parâmetros do grupo 2. RT e B estão negativamente intercorrelacionados entre si, tendo pouca correlação com os outros parâmetros.

Relativamente às posições dos tecidos no diagrama (fig. IV.12), pode-se dizer que os parâmetros do grupo 1 terão valores mais elevados para as popelinas, tendo os do grupo 2 valores maiores para a flanela.

As diferenças entre os tecidos do mesmo tipo foram causadas pelo tratamento por celulases. A dupla seta sobre os pontos de cada tipo de tecido no diagrama dá, assim, uma ideia dos parâmetros alterados pelo tratamento enzimático.

A dispersão dos pontos no mapa é semelhante para ambas as popelinas, indicando que o tratamento celulolítico faz variar essencialmente RT e B e em menor extensão os parâmetros do grupo 1 e 2.

A dispersão dos pontos na flanela, indica que tanto os parâmetros dos grupos 1 e 2, como RT e B, são alterados com o tratamento enzimático.

Estas observações são genéricas pois consideram-se 51 tecidos subdivididos em três tipos diferentes. Pode-se no entanto, concluir que ambas as popelinas têm uma variação semelhante causada pelo tratamento com celulases e que os valores dos parâmetros entre estes dois tecidos não são muito diferentes. Pelas razões expostas, o conjunto de análises seguintes foi apenas efectuado sobre a popelina e a flanela, excluindo-se a popelina mercerizada.

### 3.2- Efeitos de Cellusoft L e Denimax T em Dois Níveis de Acção Mecânica nos Parâmetros dos Tecidos

Para eliminar o problema de se terem diferentes tipos de tecidos numa mesma análise, seria de esperar que se apresentasse uma análise para todas as popelinas ou para todas as flanelas. No entanto, a variância total resultante, nos 17 tecidos, é baixa (< 50 %), pelo que se optou, por fazer a análise da acção de cada enzima em cada tecido.

Nestas quatro análises, para os dois primeiros factores extraídos, obteve-se sempre uma variância total superior a 60 %, sendo superior a 80 % a variância para a perda de peso, que é o parâmetro que mede a extensão da hidrólise (tab. IV. 7).

TABELA IV.7 - Variância (%) dos Parâmetros Mecânicos Após Extração dos Dois Primeiros Factores				
Parâmetros	Cel.Popelina	Den.Popelina	Cel.Flanela	Den.Flanela
B	88	18	28	91
EMT	99	85	66	92

G	52	73	62	47
2HB	66	48	92	91
2HG	90	41	89	62
2HG5	14	79	83	61
LC	87	47	50	12
LT	14	95	28	22
MIU	27	3	16	43
MMD	55	52	18	12
pilling	-	-	95	73
RC	62	18	70	44
RT	94	90	85	91
SMD	28	70	81	64
To	62	96	83	82
Tm	56	68	85	81
WC	49	74	76	30
WT	90	27	71	94
PP	88	98	81	91
<i>Nº tecidos</i>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>
<i>Variância total (%)</i>	<b>62,1</b>	<b>60,1</b>	<b>66,1</b>	<b>62,3</b>

Cell.-Cellusoft L, Den.-Denimax T

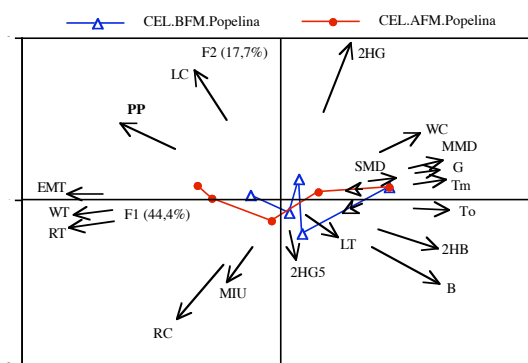


Figura IV.13- Diagramas de vetores para os factores 1 e 2 (F1/F2) relativos à acção da Cellusoft L (CEL) na popelina. BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica. O aumento da concentração de enzima nos tratamentos é visualizado pelo sentido da seta que une os pontos correspondentes aos tecidos.

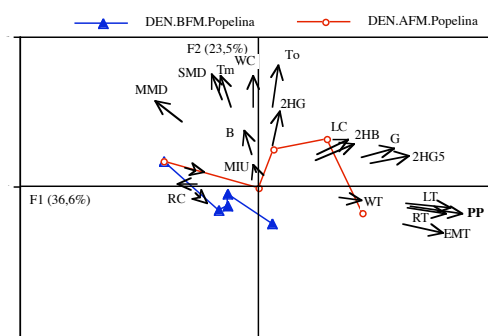


Figura IV.14- Diagramas de vetores para os factores 1 e 2 (F1/F2) relativos à acção da Denimax T (DEN) na popelina. BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica. O aumento da concentração de enzima nos tratamentos é visualizado pelo sentido da seta que une os pontos correspondentes aos tecidos.

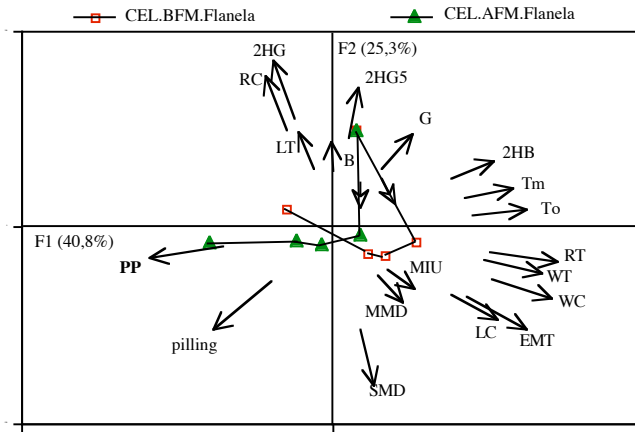


Figura IV.15- Diagramas de vectores para os factores 1 e 2 (F1/F2) relativos à acção da Cellusoft L (CEL) na flanela. BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica. O aumento da concentração de enzima nos tratamentos é visualizado pelo sentido da seta que une os pontos correspondentes aos tecidos.

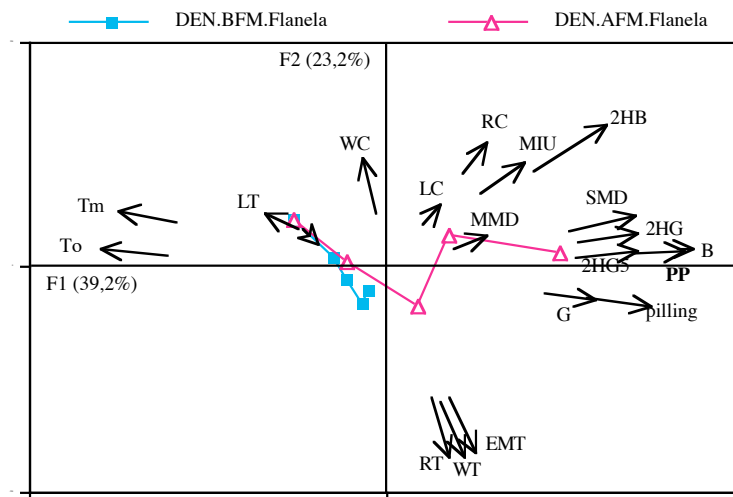


Figura IV.16- Diagramas de vectores para os factores 1 e 2 (F1/F2) relativos à acção da Denimax T (DEN) na popelina. BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica. O aumento da concentração de enzima nos tratamentos é visualizado pelo sentido da seta que une os pontos correspondentes aos tecidos.

A análise dos parâmetros correlacionados com a perda de peso, dá informações acerca dos que são na realidade alterados por cada enzima. Pelas posições dos vectores nos diagramas podemos observar que:

Tratamento da popelina com Cellusoft L (fig. IV.13):

\*PP está muito correlacionada negativamente com B, 2HB e T2,5.

\*PP está positivamente correlacionada com LC, EMT, WT e RT.

Tratamento da popelina com Denimax T (fig. IV.14):

\*PP está muito correlacionada positivamente com EMT, LT e RT.

\*PP está positivamente correlacionada com 2HB, B, 2HG5, LC e WT.

Tratamento da flanela com Cellusoft L (fig. IV.15):

\*PP está muito correlacionada negativamente com 2HB, T2,5 e T50.

\*PP está positivamente correlacionada com "pilling".

Tratamento da flanela com Denimax T (fig. IV.16):

\*PP está correlacionada negativamente com T2,5 e T50.

\*PP está positivamente correlacionada com B, 2HB, 2HG, 2HG5, SMD, G e "pilling".

Pelas posições dos tecidos, nos gráficos, verifica-se que o aumento da concentração de enzima no tratamento leva sempre a uma maior perda de peso e à respectiva variação das propriedades referidas anteriormente. O processo AFM dá ênfase às variações verificadas no processo BFM.

O tratamento da popelina com ambas as celulases aumenta os valores dos parâmetros de tracção, enquanto que o tratamento da flanela diminui a espessura por aumento do grau de "pilling" (remoção dos pêlos). Para ambos os tecidos, o tratamento com Cellusoft L diminui o valor de 2HB, enquanto que o tratamento com Denimax T aumenta o valor de 2HB.

### 3.3- Análise da Relação Entre a Absortividade Térmica com os Outros Parâmetros na Flanela Tratada com Celulases

Nesta análise só foram incluídos os cinco tecidos de flanela em que foram medidas as propriedades térmicas. A variância total para os dois primeiros factores extraídos é de 72.2 % e a variância relativa à perda de peso é de 84 % (tab. IV. 8).

Parâmetro	% Variância	Parâmetro	% Variância
AT	42	MMD	62
B	63	pilling	69
EMT	93	RC	74
G	69	RT	79
2HB	56	SMD	99
2HG	94	To	77
2HG5	90	Tm	79
LC	47	WC	60
LT	85	WT	48
MIU	76	PP	84

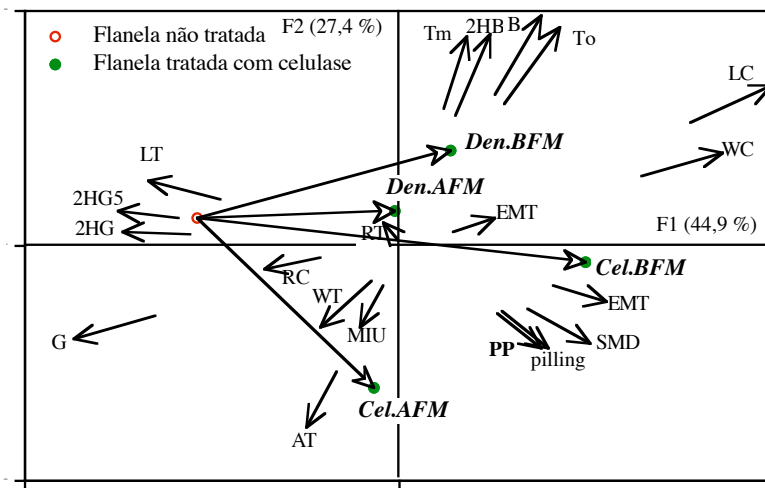


Figura IV.17- Diagramas de vectores para os factores 1 e 2 (F1/F2) para o tecido de flanela não tratado e tratado com 1% de enzima. Cel.-Cellusoft L, Den.-Denimax T, BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

Na figura IV.17 está representado o diagrama relativo a cinco tecidos de flanela, o original e os tratados com 1% de enzima Cellusoft T e Denimax T, em ambos processos BFM e AFM. Nestes tecidos foi também medida a absorvidade térmica (AT).

No diagrama podemos observar quatro grupos, em que os parâmetros estão positivamente "intercorrelacionados" entre si:

- Grupo 1 - EMT, SMD, PP e grau de "pilling"
- Grupo 2 - 2HG, 2HG5 e LT
- Grupo 3 - T50, T2,5, 2HB e B
- Grupo 4 - LC e WC

Uma análise mais detalhada indica correlação negativa entre:

- Grupos 1 e 2
- G e Grupo 4
- AT e Grupo 2

Todos os tratamentos conduzem ao aumento da intensidade dos parâmetros dos grupos 1 e 4 e à diminuição dos do grupo 2. Estas mudanças eram já esperadas, dado que o tratamento com celulases tem efeito "dippilling" (aumento do grau de pilling) e amaciador (diminuição das propriedades de corte **(91)**, diminuição esta que não é verificado nas outras análises).

Tal como verificado anteriormente, a celulase Cellusoft L origina maior perda de peso e efeito "dippilling" do que a celulase Denimax T. A acção mecânica aumenta estes efeitos para Cellusoft L. A Cellusoft L aumenta AT, diminuindo a espessura e as propriedades de flexão, sucedendo o oposto para a Denimax T. O aumento da absorvidade térmica (AT) está directamente ligado à acção "dippilling" (aumento do grau de pilling) e, por conseguinte, a um tacto mais frio do tecido **(82, 83)**. Dado o pequeno número de amostras introduzido nesta análise, teve-se algum cuidado na elaboração das conclusões, porque podem aparecer no diagrama variações não significativas.

#### 4- EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ENDOGLUCANASE (SP492-PPC3617) NA HIDRÓLISE DA POPELINA DE ALGODÃO COM UM COMPLEXO CELULOLÍTICO

A popelina foi tratada com EG (SP492-PPC3617) e posteriormente com Cellusoft L, no Linitest, em dois níveis de acção mecânica, como descrito em III.2.3.2. Pretendeu-se diferenciar a acção hidrolítica de EG e de Cellusoft L no tecido, para os dois níveis de acção mecânica usados. Estudou-se ainda o efeito do pré-tratamento com EG no tratamento final com Cellusoft L.

##### 4.1- Efeitos dos Tratamentos com a Endoglucanase (SP492-PPC3617) no Algodão

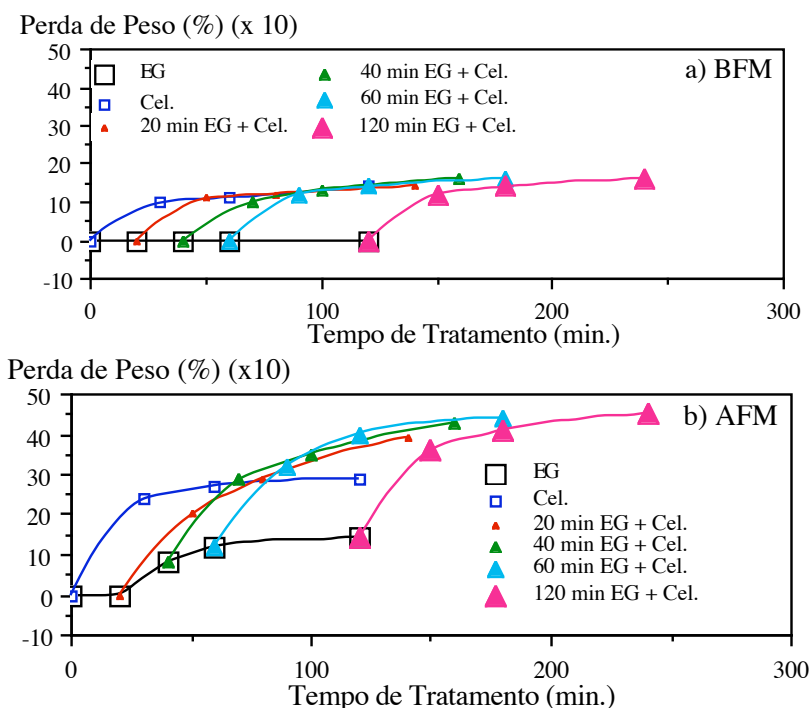


Figura IV.18- Efeitos do tempo de tratamento com EG e com Cellusoft L na perda de peso dos tecidos tratados. (Cel.-Cellusoft L, EG-SP492-PPC3617) a)-BFM (Baixa Fricção Mecânica) b) AFM (Alta Fricção Mecânica)

No processo com baixa fricção mecânica (BFM), da acção da EG (SP492-PPC3617) não resulta qualquer perda de peso (fig. IV.18) no tecido tratado, nem a formação de açúcares redutores no líquido de tratamento (fig. IV.19). Contudo, a acção da EG (BFM) é verificada pelo aumento do poder reductor (fig. IV.20) e pela perda da força de rotura (em %) do algodão (fig. IV.21). De notar que estas duas propriedades atingem um valor constante após os primeiros 20 minutos de tratamento, sugerindo-se que isto possa corresponder a um nível de saturação da adsorção de enzima e a um ataque hidrolítico na área mais acessível das fibras. A pouca fricção mecânica e a falta de componentes "exo" no sistema enzimático, não incapazes de "arrancar" as cadeias de celulose aleatoriamente partidas, da superfície das fibras.

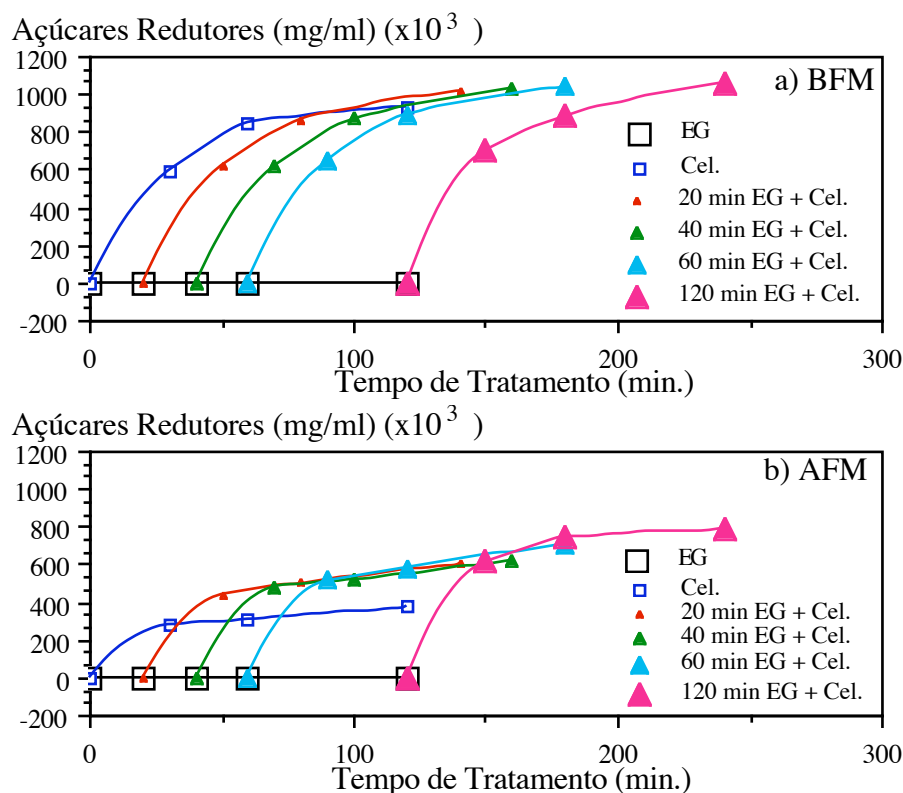


Figura IV.19 - Efeitos do tempo de tratamento com EG e com Cellusoft L na concentração de açúcares redutores no líquido de tratamento. (Cel.-Cellusoft L, EG-SP492-PPC3617) a)-BFM (Baixa Fricção Mecânica) b) AFM (Alta Fricção Mecânica)

No tratamento com alta fricção mecânica (AFM) durante 40 ou mais minutos, a acção da EG produz um aumento significativo da perda de peso dos tecidos tratados (fig. IV.18), não se detectando, tal como no processo BFM, açúcares redutores no líquido de tratamento. Estes factos são concordantes com o facto de se ter encontrado um depósito de pó de algodão no líquido de tratamento em suspensão. A presença deste pó é devida à acção conjunta da EG com a AFM, já que um tratamento sem qualquer enzima com alta fricção mecânica durante 200 minutos não produz uma perda de peso inferior a 0.2 %, não se verificando qualquer depósito de pó de algodão.

O poder reductor produzido pela acção de EG, nos tecidos, é menor no processo AFM de que em BFM (fig. IV.20), tendendo a ser reduzido com o tempo de tratamento em AFM. Isto sugere que a acção conjunta da EG e de AFM remove material microfibrilar com alto poder reductor.

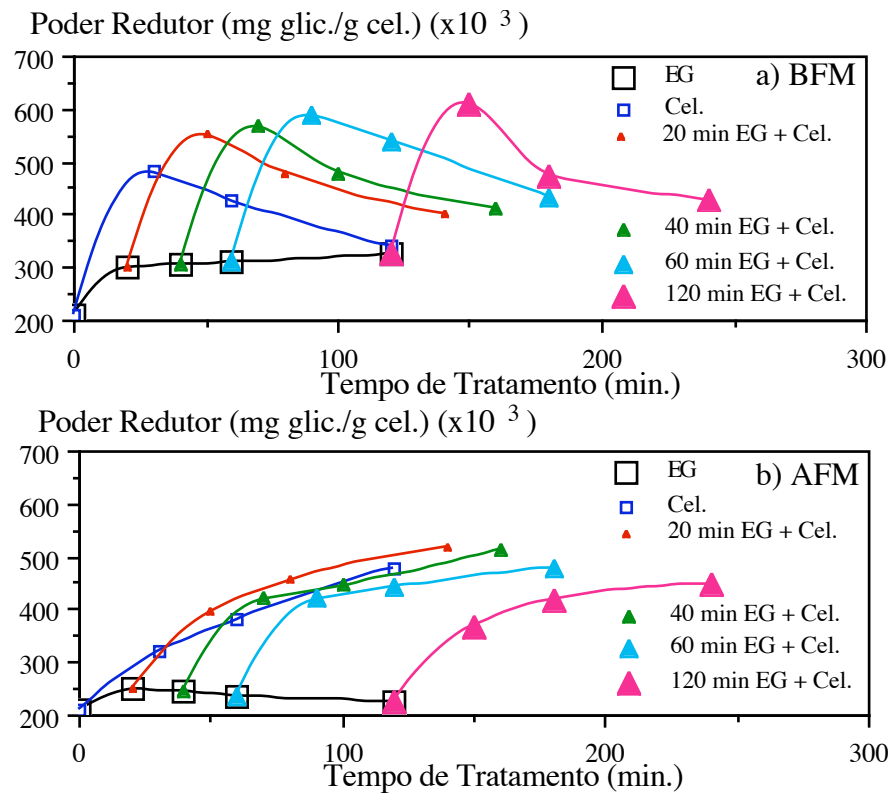


Figura IV.20 - Efeitos do tempo de tratamento com EG e com Cellusoft L no poder redutor dos tecidos tratados. (Cel.-Cellusoft L, EG-SP492-PPC3617) a)-BFM (Baixa Fricção Mecânica) b) AFM (Alta Fricção Mecânica)

O aumento progressivo da perda da força de rotura pelos tecidos tratados com EG em AFM (fig. IV.21), evidencia uma vez mais a acção sinérgica da enzima e da acção mecânica, já que após 120 minutos de tratamento, uma perda de peso de 1.5 % causa uma perda de força de rotura superior a 35%. Este comportamento é típico da actividade "endo", em que a quebra aleatória da cadeia do polímero diminui o seu comprimento médio, reduzindo por isso dramaticamente, a sua resistência a tracção.

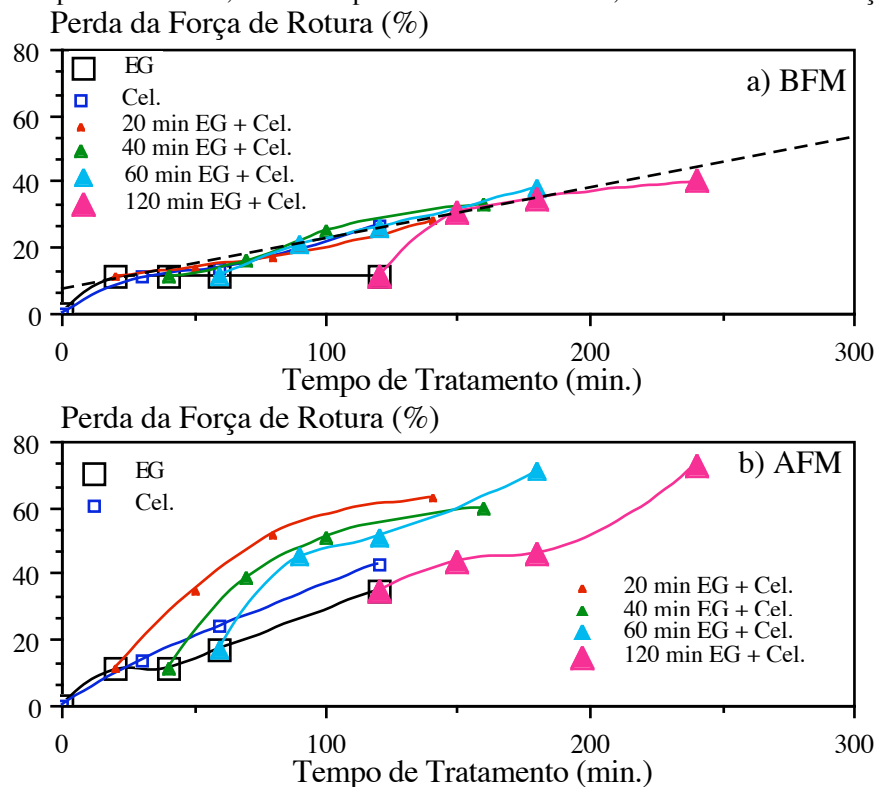


Figura IV.21 - Efeitos do tempo de tratamento com EG e com Cellusoft L na perda da força de rotura dos tecidos tratados. (Cel.-Cellusoft L, EG-SP492-PPC3617) a)-BFM (Baixa Fricção Mecânica) b) AFM (Alta Fricção Mecânica)

#### 4.2- Efeitos dos Tratamentos com Cellusoft L no Algodão

O tratamento com Cellusoft L em BFM produz uma perda de peso semelhante para todos os tecidos, quer sejam pré-tratados com EG ou não (fig. IV.18). O pré-tratamento com EG (no período de 20 a 120 min de pré- -tratamento) aumenta ligeiramente a formação de açúcares redutores (fig. IV.19) no líquido de tratamento com Cellusoft L. Estes resultados são concordantes com o aumento constante do poder redutor (fig. IV.20) dos tecidos pré-tratados com EG após os primeiros 20 minutos.

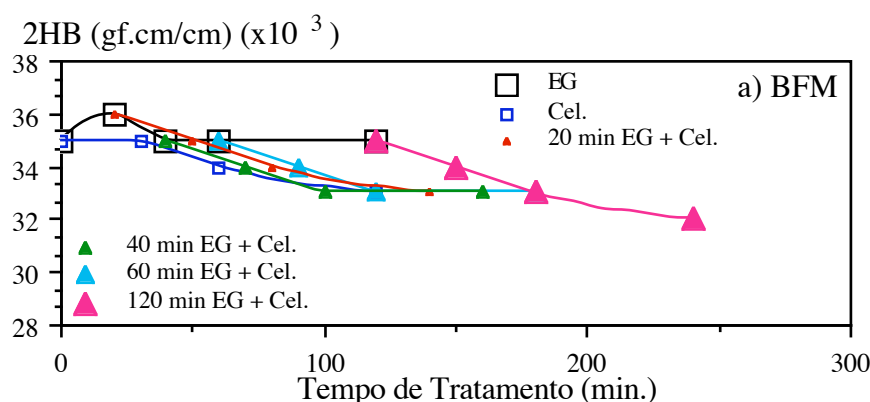
O poder redutor dos tecidos tratados com Cellusoft L aumenta para um valor máximo após os primeiros 30 minutos de tratamento BFM (fig. IV.20), diminuindo para tempos de tratamento superiores. Estes resultados verificam-se para qualquer tecido, quer seja pré-tratado com EG ou não. O valor máximo do poder redutor parece ser devido à acção "endo" de Cellusoft L, pela produção aleatória de extremidades reductoras e, a diminuição posterior do poder redutor, parece ser devida à remoção destas extremidades reductoras pela acção "exo" de Cellusoft L. Estes factos foram já observados anteriormente para a hidrólise de outras celulosas e com outros complexos celulolíticos (92). Da observação do gráfico BFM da figura IV.20, parece evidente que o poder redutor dos tecidos tratados seja sempre resultante da soma das acções de Cellusoft L e de EG, não existindo assim evidência de que o pré-tratamento com EG aumente significativamente a extensão da hidrólise no processo BFM.

A perda da força de rotura (fig. IV.21) dos tecidos em BFM, após os tratamentos com Cellusoft L, é aproximadamente proporcional à soma do tempo de tratamento de EG e de Cellusoft L, sugerindo este resultado que pré- tratamentos longos com EG originem maiores perdas de resistência em tratamentos subsequentes com Cellusoft L. Estes resultados da perda da força de rotura são a única evidência, nos processos BFM, de que o pré-tratamento com EG potencia o subsequente ataque com Cellusoft L.

Os tratamentos com alta fricção mecânica (AFM) com Cellusoft L originam maior perda de peso (fig. IV.18) e menor concentração de açúcares redutores solúveis (fig. IV.19) do que em BFM. Isto sugere que o comprimento médio dos açúcares após o processo AFM seja superior ao obtido no processo BFM, o que se confirma pela maior turvação do líquido de tratamento nos processos AFM com Cellusoft L. Como a produção de açúcares redutores está associada à acção "exo", pode-se especular que, num processo competitivo (47) de adsorção, a acção mecânica vai reduzir a actividade "exo" e aumentar a actividade preferencial "endo". O poder redutor (fig. IV.20) aumenta progressivamente com o processo AFM no tratamento com Cellusoft L, sugerindo que, em vez da acção "exo" de Cellusoft L seja a acção mecânica a remover as cadeias hidrolisadas, deixando "superfície livre" para a acção "endo". A perda de força de rotura (fig. IV.21) também aumenta bastante mais para AFM do que para BFM, suportando a hipótese da acção sinérgica entre a acção mecânica e a acção "endo" na hidrólise do algodão.

#### 4.3- Fotografias de Microscopia Electrónica e Histerese de Flexão dos Tecidos Tratados

Os tratamentos BFM com EG não alteram muito a histerese de flexão dos tecidos (2HB), enquanto que os tratamentos AFM a aumentam (fig. IV.22). As fotografias de microscopia electrónica mostram que, a acção conjunta de EG com AFM provoca o levantamento de fragmentos de fibrilas à superfície das fibras (fig. IV.23 comparar a) com b), c) e com f),g)), aumentando a fricção interfibras e confirmando o aumento de 2HB (91) (o que não sucede com BFM).





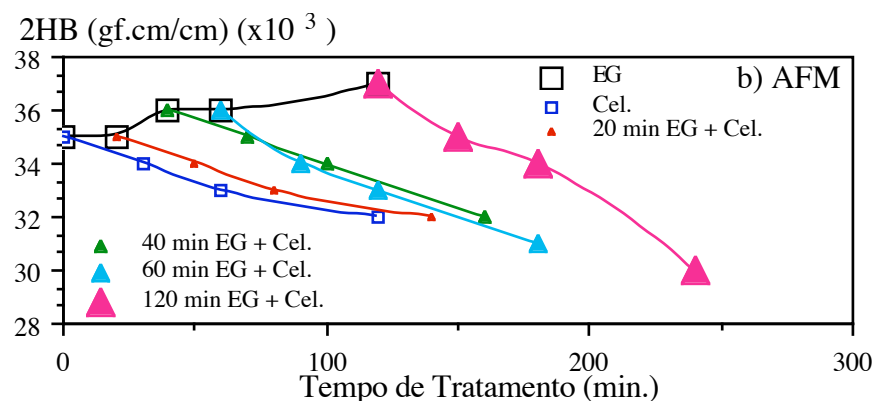


Figura IV.22 - Efeitos do tempo de tratamento com EG e com Cellusoft L na histerese de flexão dos tecidos tratados. (Cel.-Cellusoft L, EG-SP492-PPC3617) a)-BFM (Baixa Fricção Mecânica) b) AFM (Alta Fricção Mecânica)

A acção de Cellusoft L nos processos AFM e BFM traduz-se pela diminuição da histerese de flexão dos tecidos (2HB) tratados (fig. IV.22). As fibras são limpas e polidas (fig. IV.23, comparar b) e c) com e)), diminuindo a fricção interfibras e, portanto, diminuindo o valor de 2HB. A diminuição de 2HB também pode ser devida à remoção de material fibrilar, especialmente após a formação de fendas na parede primária e secundária (fig. IV. 23 d), h)). Pode-se dizer que, em geral, o tratamento com EG torna os tecidos menos flexíveis, sucedendo o contrário para o tratamento com Cellusoft L (94).

A análise dos parâmetros correlacionados com a perda de peso, dá informações acerca dos que são na realidade alterados por cada enzima. Pelas posições dos vectores nos diagramas podemos observar que:

Tratamento da popelina com Cellusoft L (fig. IV.13):

\*PP está muito correlacionada negativamente com B, 2HB e T2,5.

\*PP está positivamente correlacionada com LC, EMT, WT e RT.

Tratamento da popelina com Denimax T (fig. IV.14):

\*PP está muito correlacionada positivamente com EMT, LT e RT.

\*PP está positivamente correlacionada com 2HB, B, 2HG5, LC e WT.

Tratamento da flanela com Cellusoft L (fig. IV.15):

\*PP está muito correlacionada negativamente com 2HB, T2,5 e T50.

\*PP está positivamente correlacionada com "pilling".

Tratamento da flanela com Denimax T (fig. IV.16):

\*PP está correlacionada negativamente com T2,5 e T50.

\*PP está positivamente correlacionada com B, 2HB, 2HG, 2HG5, SMD, G e "pilling".

Pelas posições dos tecidos, nos gráficos, verifica-se que o aumento da concentração de enzima no tratamento leva sempre a uma maior perda de peso e à respectiva variação das propriedades referidas anteriormente. O processo AFM dá ênfase às variações verificadas no processo BFM.

O tratamento da popelina com ambas as celulasas aumenta os valores dos parâmetros de tracção, enquanto que o tratamento da flanela diminui a espessura por aumento do grau de "pilling" (remoção dos pêlos). Para ambos os tecidos, o tratamento com Cellusoft L diminui o valor de 2HB, enquanto que o tratamento com Denimax T aumenta o valor de 2HB.

### 3.3- Análise da Relação Entre a Absortividade Térmica com os Outros Parâmetros na Flanela Tratada com Celulasas

Nesta análise só foram incluídos os cinco tecidos de flanela em que foram medidas as propriedades térmicas. A variância total para os dois primeiros factores extraídos é de 72.2 % e a variância relativa à perda de peso é de 84 % (tab. IV. 8).

Parâmetro	% Variância	Parâmetro	% Variância
AT	42	MMD	62
B	63	pilling	69
EMT	93	RC	74
G	69	RT	79
2HB	56	SMD	99

2HG	94	To	77
2HG5	90	Tm	79
LC	47	WC	60
LT	85	WT	48
MIU	76	PP	84

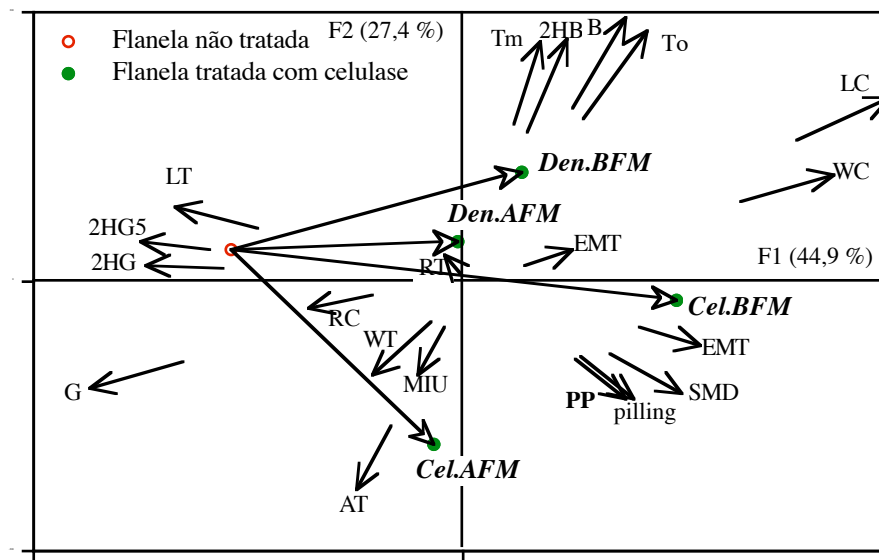


Figura IV.17- Diagramas de vectores para os factores 1 e 2 (F1/F2) para o tecido de flanela não tratado e tratado com 1% de enzima.Cel.-Cellusoft L, Den.-Denimax T, BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

Na figura IV.17 está representado o diagrama relativo a cinco tecidos de flanela, o original e os tratados com 1% de enzima Cellusoft T e Denimax T, em ambos processos BFM e AFM. Nestes tecidos foi também medida a absorvidade térmica (AT).

No diagrama podemos observar quatro grupos, em que os parâmetros estão positivamente "intercorrelacionados" entre si:

- Grupo 1 - EMT, SMD, PP e grau de "pilling"
- Grupo 2 - 2HG, 2HG5 e LT
- Grupo 3 - T50, T2,5, 2HB e B
- Grupo 4 - LC e WC

Uma análise mais detalhada indica correlação negativa entre:

- Grupos 1 e 2
- G e Grupo 4
- AT e Grupo 2

Todos os tratamentos conduzem ao aumento da intensidade dos parâmetros dos grupos 1 e 4 e à diminuição dos do grupo 2. Estas mudanças eram já esperadas, dado que o tratamento com celulases tem efeito "dippilling" (aumento do grau de pilling) e amaciador (diminuição das propriedades de corte (91), diminuição esta que não é verificado nas outras análises).

Tal como verificado anteriormente, a celulase Cellusoft L origina maior perda de peso e efeito "dippilling" do que a celulase Denimax T. A acção mecânica aumenta estes efeitos para Cellusoft L. A Cellusoft L aumenta AT, diminuindo a espessura e as propriedades de flexão, sucedendo o oposto para a Denimax T. O aumento da absorvidade térmica (AT) está directamente ligado à acção "dippilling" (aumento do grau de pilling) e, por conseguinte, a um tacto mais frio do tecido (82, 83). Dado o pequeno número de amostras introduzido nesta análise, teve-se algum cuidado na elaboração das conclusões, porque podem aparecer no diagrama variações não significativas.

#### 4- EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ENDOGLUCANASE (SP492-PPC3617) NA HIDRÓLISE DA POPELINA DE ALGODÃO COM UM COMPLEXO CELULOLÍTICO

A popelina foi tratada com EG (SP492-PPC3617) e posteriormente com Cellusoft L, no Linitest, em dois níveis de acção mecânica, como descrito em III.2.3.2. Pretendeu-se diferenciar a acção hidrolítica de EG e de Cellusoft L no tecido, para os dois níveis de acção mecânica usados. Estudou-se ainda o efeito do pré-tratamento com EG no tratamento final com Cellusoft L.

##### 4.1- Efeitos dos Tratamentos com a Endoglucanase (SP492-PPC3617) no Algodão

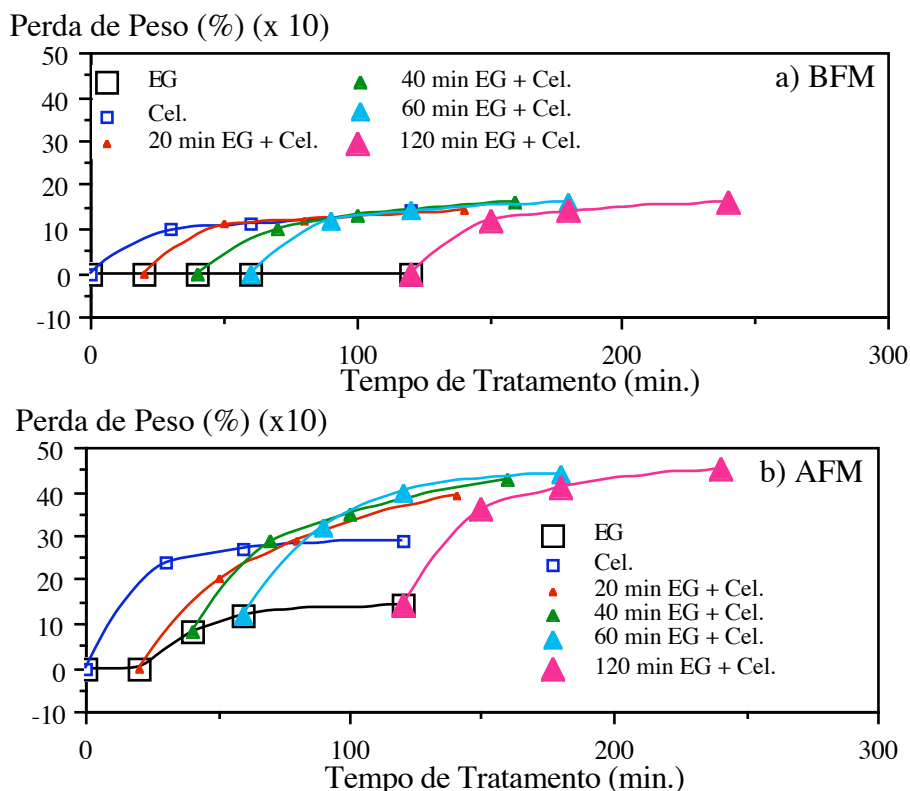


Figura IV.18- Efeitos do tempo de tratamento com EG e com Cellusoft L na perda de peso dos tecidos tratados. (Cel.-Cellusoft L, EG-SP492-PPC3617) a)-BFM (Baixa Fricção Mecânica) b) AFM (Alta Fricção Mecânica)

No processo com baixa fricção mecânica (BFM), da acção da EG (SP492-PPC3617) não resulta qualquer perda de peso (fig. IV.18) no tecido tratado, nem a formação de açúcares redutores no líquido de tratamento (fig. IV.19). Contudo, a acção da EG (BFM) é verificada pelo aumento do poder redutor (fig. IV.20) e pela perda da força de rotura (em %) do algodão (fig. IV.21). De notar que estas duas propriedades atingem um valor constante após os primeiros 20 minutos de tratamento, sugerindo-se que isto possa corresponder a um nível de saturação da adsorção de enzima e a um ataque hidrolítico na área mais acessível das fibras. A pouca fricção mecânica e a falta de componentes "exo" no sistema enzimático, não incapazes de "arrancar" as cadeias de celulose aleatoriamente partidas, da superfície das fibras.

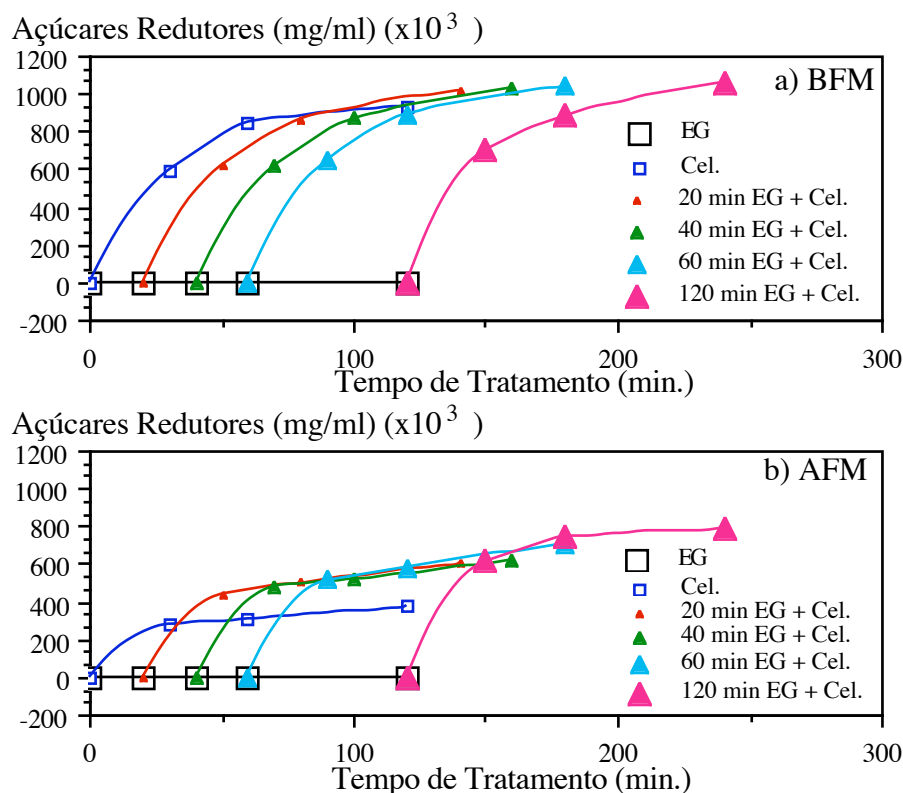
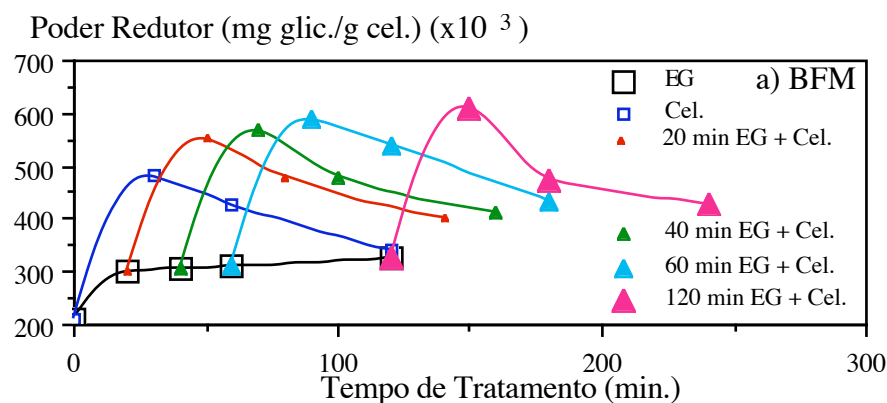


Figura IV.19 - Efeitos do tempo de tratamento com EG e com Cellusoft L na concentração de açúcares redutores no líquido de tratamento. (Cel.-Cellusoft L, EG-SP492-PPC3617) a)-BFM (Baixa Fricção Mecânica) b) AFM (Alta Fricção Mecânica)

No tratamento com alta fricção mecânica (AFM) durante 40 ou mais minutos, a acção da EG produz um aumento significativo da perda de peso dos tecidos tratados (fig. IV.18), não se detectando, tal como no processo BFM, açúcares redutores no líquido de tratamento. Estes factos são concordantes com o facto de se ter encontrado um depósito de pó de algodão no líquido de tratamento em suspensão. A presença deste pó é devida à acção conjunta da EG com a AFM, já que um tratamento sem qualquer enzima com alta fricção mecânica durante 200 minutos não produz uma perda de peso inferior a 0.2 %, não se verificando qualquer depósito de pó de algodão.

O poder redutor produzido pela acção de EG, nos tecidos, é menor no processo AFM de que em BFM (fig. IV.20), tendendo a ser reduzido com o tempo de tratamento em AFM. Isto sugere que a acção conjunta da EG e de AFM remove material microfibrilar com alto poder redutor.



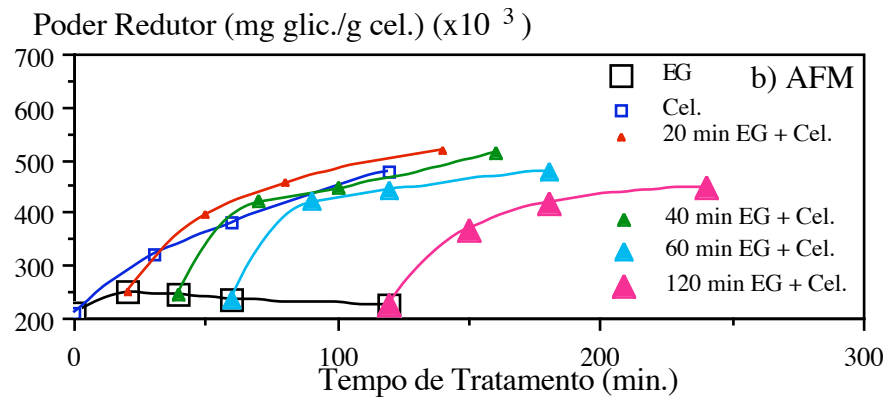


Figura IV.20 - Efeitos do tempo de tratamento com EG e com Cellusoft L no poder redutor dos tecidos tratados. (Cel.-Cellusoft L, EG-SP492-PPC3617) a)-BFM (Baixa Fricção Mecânica) b) AFM (Alta Fricção Mecânica)

O aumento progressivo da perda da força de rotura pelos tecidos tratados com EG em AFM (fig. IV.21), evidencia uma vez mais a ação sinérgica da enzima e da ação mecânica, já que após 120 minutos de tratamento, uma perda de peso de 1.5 % causa uma perda de força de rotura superior a 35%. Este comportamento é típico da actividade "endo", em que a quebra aleatória da cadeia do polímero diminui o seu comprimento médio, reduzindo por isso dramaticamente, a sua resistência a tracção.

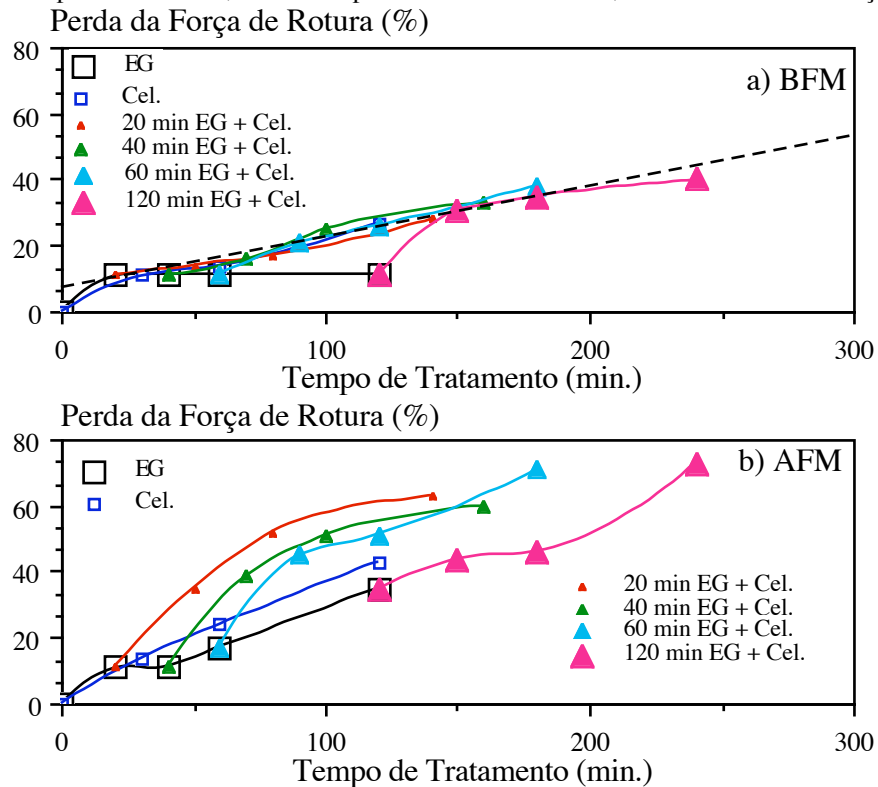


Figura IV.21 - Efeitos do tempo de tratamento com EG e com Cellusoft L na perda da força de rotura dos tecidos tratados. (Cel.-Cellusoft L, EG-SP492-PPC3617) a)-BFM (Baixa Fricção Mecânica) b) AFM (Alta Fricção Mecânica)

#### 4.2- Efeitos dos Tratamentos com Cellusoft L no Algodão

O tratamento com Cellusoft L em BFM produz uma perda de peso semelhante para todos os tecidos, quer sejam pré-tratados com EG ou não (fig. IV.18). O pré-tratamento com EG (no período de 20 a 120 min de pré- -tratamento) aumenta ligeiramente a formação de açúcares redutores (fig. IV.19) no líquido de tratamento com Cellusoft L. Estes resultados são concordantes com o aumento constante do poder redutor (fig. IV.20) dos tecidos pré-tratados com EG após os primeiros 20 minutos.

O poder redutor dos tecidos tratados com Cellusoft L aumenta para um valor máximo após os primeiros 30 minutos de tratamento BFM (fig. IV.20), diminuindo para tempos de tratamento superiores. Estes resultados verificam-se para qualquer tecido, quer seja pré-tratado com EG ou não. O valor

máximo do poder reductor parece ser devido à acção "endo" de Cellusoft L, pela produção aleatória de extremidades reductoras e, a diminuição posterior do poder reductor, parece ser devida à remoção destas extremidades reductoras pela acção "exo" de Cellusoft L. Estes factos foram já observados anteriormente para a hidrólise de outras celulosas e com outros complexos celulolíticos (92). Da observação do gráfico BFM da figura IV.20, parece evidente que o poder reductor dos tecidos tratados seja sempre resultante da soma das acções de Cellusoft L e de EG, não existindo assim evidência de que o pré-tratamento com EG aumente significativamente a extensão da hidrólise no processo BFM.

A perda da força de rotura (fig. IV.21) dos tecidos em BFM, após os tratamentos com Cellusoft L, é aproximadamente proporcional à soma do tempo de tratamento de EG e de Cellusoft L, sugerindo este resultado que pré- tratamentos longos com EG originem maiores perdas de resistência em tratamentos subsequentes com Cellusoft L. Estes resultados da perda da força de rotura são a única evidência, nos processos BFM, de que o pré-tratamento com EG potencia o subsequente ataque com Cellusoft L.

Os tratamentos com alta fricção mecânica (AFM) com Cellusoft L originam maior perda de peso (fig. IV.18) e menor concentração de açúcares reductores solúveis (fig. IV.19) do que em BFM. Isto sugere que o comprimento médio dos açúcares após o processo AFM seja superior ao obtido no processo BFM, o que se confirma pela maior turvação do líquido de tratamento nos processos AFM com Cellusoft L. Como a produção de açúcares reductores está associada à acção "exo", pode-se especular que, num processo competitivo (47) de adsorção, a acção mecânica vai reduzir a actividade "exo" e aumentar a actividade preferencial "endo". O poder reductor (fig. IV.20) aumenta progressivamente com o processo AFM no tratamento com Cellusoft L, sugerindo que, em vez da acção "exo" de Cellusoft L seja a acção mecânica a remover as cadeias hidrolisadas, deixando "superfície livre" para a acção "endo". A perda de força de rotura (fig. IV.21) também aumenta bastante mais para AFM do que para BFM, suportando a hipótese da acção sinérgica entre a acção mecânica e a acção "endo" na hidrólise do algodão.

#### 4.3- Fotografias de Microscopia Electrónica e Histerese de Flexão dos Tecidos Tratados

Os tratamentos BFM com EG não alteram muito a histerese de flexão dos tecidos (2HB), enquanto que os tratamentos AFM a aumentam (fig. IV.22). As fotografias de microscopia electrónica mostram que, a acção conjunta de EG com AFM provoca o levantamento de fragmentos de fibrilas à superfície das fibras (fig. IV.23 comparar a) com b), c) e com f),g)), aumentando a fricção interfibras e confirmando o aumento de 2HB (91) (o que não sucede com BFM).

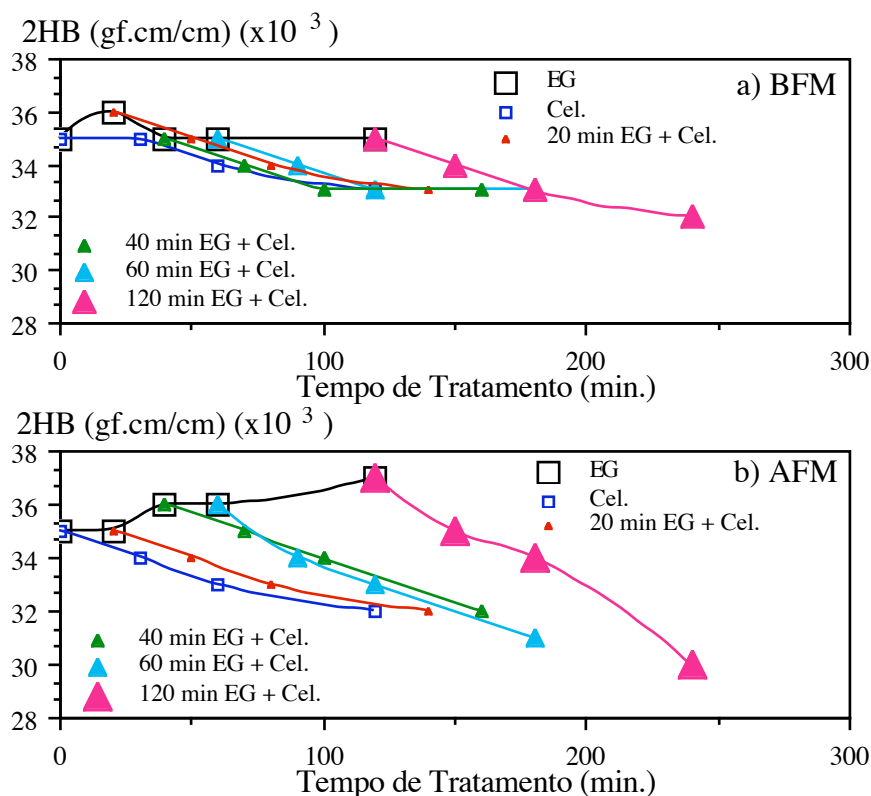


Figura IV.22 - Efeitos do tempo de tratamento com EG e com Cellusoft L na histerese de flexão dos tecidos tratados. (Cel.-Cellusoft L, EG-SP492-PPC3617) a)-BFM (Baixa Fricção Mecânica) b) AFM (Alta Fricção Mecânica)

A acção de Cellusoft L nos processos AFM e BFM traduz-se pela diminuição da histerese de flexão dos tecidos (2HB) tratados (fig. IV.22). As fibras são limpas e polidas (fig. IV.23, comparar b) e c)

com e)), diminuindo a fricção interfibras e, portanto, diminuindo o valor de 2HB. A diminuição de 2HB também pode ser devida à remoção de material fibrilar, especialmente após a formação de fendas na parede primária e secundária (fig. IV. 23 d, h)). Pode-se dizer que, em geral, o tratamento com EG torna os tecidos menos flexíveis, sucedendo o contrário para o tratamento com Cellusoft L (94).

Figura IV.23 - Fotografias de microscopia electrónica de varrimento. a) Fibras do tecido lavado com água, 200 minutos, no processo com alta fricção mecânica (AFM). b) Fibras do tecido tratado com EG (SP492-PPC3617), 20 minutos, no processo com alta fricção mecânica (AFM). c) Fibras do tecido tratado com EG(SP492-PPC3617), 120 minutos, no processo com alta fricção mecânica (AFM). d) Fibras do tecido tratado com Cellusoft L, 120 minutos, no processo com alta fricção mecânica (AFM). e) Fibras do tecido tratado com EG(SP492-PPC3617), 120 minutos, e posteriormente tratado com Cellusoft L, 120 minutos, em processos com alta fricção mecânica (AFM). f) Fibras do tecido tratado com EG(SP492-PPC3617), 20 minutos, no processo com baixa fricção mecânica (BFM). g) Fibras do tecido tratado com EG(SP492-PPC3617), 120 minutos, no processo com baixa fricção mecânica (BFM). h) Fibras do tecido tratado com Cellusoft L, 120 minutos, no processo com baixa fricção mecânica (BFM). i) Fibras do tecido tratado com EG(SP492-PPC3617), 120 minutos, e posteriormente tratado com Cellusoft L, 120 minutos, em processos com baixa fricção mecânica (BFM).

Para ver as fotos da figura IV.23, ver o artigo (que também existe no repositório)

Cavaco-Paulo, L. Almeida, D. Bishop, EFFECTS OF AGITATION AND ENDOGLUCANASE PRETREATMENT ON THE HYDROLYSIS OF COTTON FABRICS BY A TOTAL CELLULASE, *Textile Research Journal*, May 1996, 287-294

#### 4.4- Cristalinidade dos Tecidos Tratados

A cristalinidade dos tecidos tratados em ambos os processos AFM e BFM e com ambas as enzimas (EG, SP492-PPC3617 e Cellusoft L) não é alterada significativamente, como se mostra na tabela IV.9. (Ver comentários em IV.5.4.)

TABELA IV.9 - Índice de Cristalinidade		
Tecido	BFM	AFM
Controlo (Popelina da Algodão)	0.83	0.83
Popelina tratada com EG 120 min	0.82	0.82
Popelina tratada com Cellusoft L 120 min	0.83	0.83
Popelina tratada com EG 120 min + Cel 120 min	0.83	0.83

BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

#### 5- TRATAMENTOS LONGOS E CURTOS COM CRUDES DE *TRICHODERMA REESEI*

Amostras de popelina foram tratadas com crudes de mutantes de *T. reesei*, nos copos do Linitest até 240 minutos (tratamento curto, agitação tipo BFM, de baixa fricção mecânica) e num matraz, até 13 dias, numa incubadora (tratamento longo). Pretendeu-se diferenciar, nos dois tratamentos feitos, o modo de acção dos crudes dos mutantes da *T. reesei*, em que se apagaram a CBH I e II, ou em que se apagaram a EG I e II. Foram ainda feitas comparações entre estas misturas celulolíticas e o crude total, CT.

##### 5.1- Perda de Peso das Popelinas Tratadas

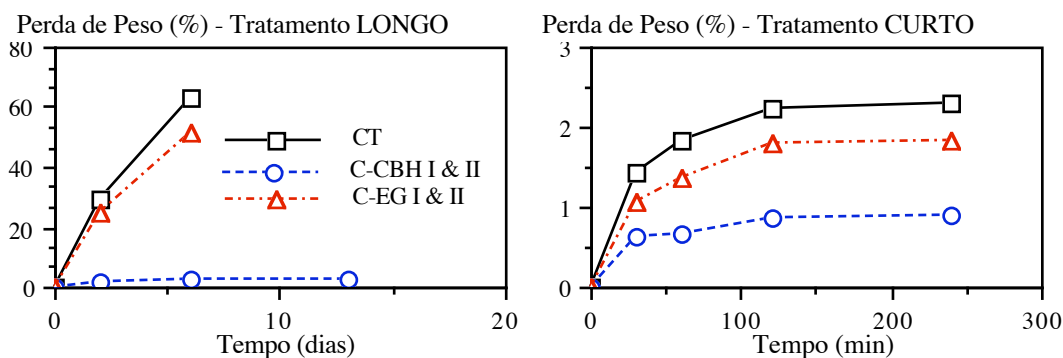


Figura IV.24 - Efeitos do tempo de tratamento com crudes de *T.reesei* na perda de peso dos tecidos tratados.



Figura IV.25 - Fotografias de microscopia electrónica de varrimento dos tecidos tratados. a) Fibras do tecido não tratado. b) Fibras do tecido tratado com o crude total, CT, durante seis dias numa incubadora. c) Fibras do tecido tratado com C-EG I & II, durante seis dias numa incubadora. d) Fibras do tecido tratado com C-CBH I & II, durante seis dias numa incubadora. e) Fibras do tecido tratado com o crude total, CT durante 240 minutos no Linitest com baixa fricção mecânica. f) Fibras do tecido tratado com C-EG I & II, durante 240 minutos no Linitest com baixa fricção mecânica. g) Fibras do tecido tratado com C-CBH I & II, durante 240 minutos no Linitest com baixa fricção mecânica.

Para ver as fotos da figura IV.25, ver o artigo (que também existe no repositório)

Cavaco-Paulo, L. Almeida, D. Bishop, CELLULASE ACTIVITIES AND FINISHING EFFECTS, *Textile Chemist & Colorist*, June 1996, 28-32

Cavaco-Paulo, L. Almeida, D. Bishop, THE TREATMENT OF COTTON CELLULOSE WITH TRICHODERMA REESEI ENGINEERED CELLULASES, in "The Chemistry and Processing of Wood and Plant Fibrous Materials", Ed. by P. A. Williams, J. F. Kennedy, Woodhead-Cambridge, 1996, pp.227-234

O apagamento da actividade de CBH I e II do crude celulótico de *T. reesei*, reduz a actividade de C-CBH I & II no algodão, medida como perda de peso (fig IV.24 - tratamento longo), mostrando a importância da actividade "exo" na hidrólise enzimática da celulose do algodão. Do sinergismo conhecido entre as actividades "endo" e "exo" (46, 47) poder-se-ia esperar que o apagamento das EGs levasse, também, a uma redução drástica da actividade de C-EG I & II. No entanto, esta mistura celulolítica produz apenas uma perda de peso ligeiramente inferior à do crude total, CT. Esta alta actividade de C-EG I & II pode dever-se à presença de EG III e EG V e/ou a algum carácter "endo" de ambas CBHs. Nas fotografias de microscopia electrónica das amostras tratadas (fig. IV.25), parece provável que C-EG I & II seja capaz de hidrolisar totalmente o algodão, muito embora em tempos ligeiramente superiores ao CT.

O tratamento curto foi realizado com baixa fricção mecânica (BFM), enquanto que o tratamento longo foi realizado sem qualquer acção mecânica. A pouca acção mecânica, no tratamento curto, aumenta a actividade relativa de C-CBH I & II e diminui as actividades de CT e C-EG I & II relativamente ao tratamento longo (fig. IV.24), apesar de C-CBH I & II estar duas vezes mais concentrada no tratamento longo efectuado. Confirma-se assim, uma vez mais, a acção sinérgica entre a actividade "endo" e a acção mecânica, durante os tratamentos.

De notar que a perda de peso até 3 % deixa as fibras estruturalmente intactas (fig. IV.25), enquanto que a perda de peso superior a 50 % conduz à degradação extensiva das fibras.

### 5.2-Comprimento Médio dos Açúcares Hidrolisados

Comprimento Médio dos Açúcares Hidrolisados - Tratamento CURTO

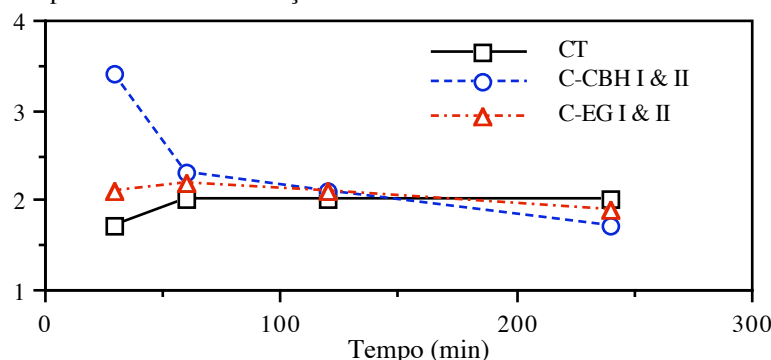


Figura IV.26 - Efeito do tempo de tratamento com crudes de *T.reesei* no comprimento médio dos açúcares hidrolisados.

CT e C-EG I & II produzem açúcares solúveis (fig. IV.26) com um comprimento de cerca de 2 unidades glicosídicas, para todos os tempos de tratamento, como se pode esperar pela sua maior acção "exo". C-CBH I & II diminui o comprimento dos açúcares solúveis de 3.4 (30 min) para 1.7 (120 min). Este resultado sugere que, inicialmente, a clivagem de C-CBH I & II se dá com maior frequência na celulose insolúvel e com a produção de açúcares solúveis, que, ao serem hidrolisados, reduzem o seu comprimento. A redução lenta do comprimento dos açúcares poderá também dever-se à mais baixa frequência de clivagem, já verificada, nos açúcares solúveis pelas EGs, quando comparadas com as CBHs de *T.reesei* (48).

### 5.3- Poder Redutor e Viscosidade Específica de Soluções CED dos Tecidos Tratados

A actividade "endo", predominante em C-CBH I & II, produz a esperada quebra aleatória das cadeias da celulose do algodão. Isto implica que o poder redutor dos tecidos tratados aumente



rapidamente, mesmo com pouca perda de peso (fig. IV.27), e com uma redução acentuada da viscosidade específica das soluções de CED dos tecidos tratados. CT e C-EG I & II produzem tecidos com um poder redutor semelhante aos tratados com C-CBH I & II, apesar de apresentarem uma perda de peso significativamente maior, embora com uma viscosidade das suas soluções semelhante à do tecido não tratado (fig. IV.27). A grande perda de peso provocada por CT e C-EG I & II, pode ser assumida como a acção repetida, localizada, "exo", capaz de produzir unidades de celobiose para a solução, sendo a formação de grupos redutores devida à própria acção "endo". Neste caso, a acção "endo" de CT e C-EG I & II parece ser mais localizada, de maneira a que o grau de polimerização da celulose do algodão residual não seja alterado, como se verifica pela variação de viscosidade na figura IV.27.

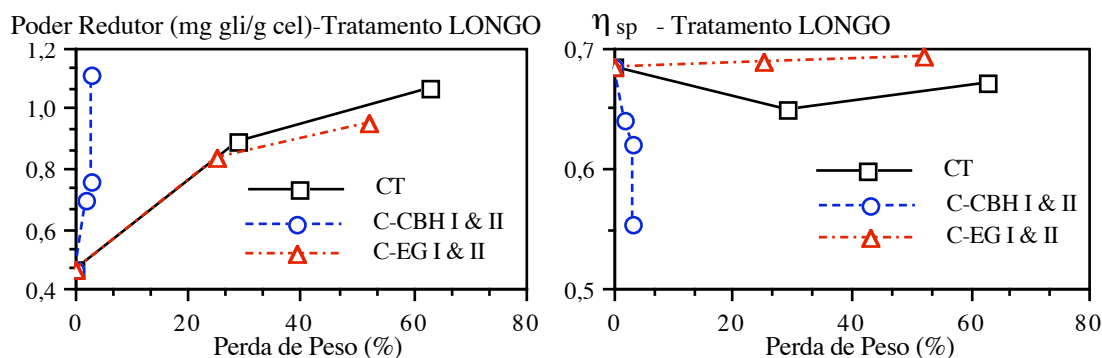


Figura IV.27 - Efeitos do tempo de tratamento com crudes de *T.reesei* no poder redutor dos tecidos e na viscosidade específica de soluções de CED de celulose do algodão tratado.

A relação entre o poder redutor dos tecidos e o inverso da viscosidade específica (fluidez) de soluções de CED de celulose do algodão tratado (fig. IV.28), mostra o grau aleatório do ataque enzimático, através do declive da recta resultante da relação entre os referidos parâmetros. A acção de C-CBH I & II mostra ser a mais aleatória sobre a celulose do algodão e a acção de C-EG I & II mostra ser a mais localizada, enquanto que CT mostra ter um efeito intermédio. O grau aleatório da acção celulolítica de Endoglucanases é geralmente medido usando CMC como substrato solúvel (22), não se conhecendo na literatura este tipo de relações para a celulose do algodão após hidrólise enzimática.

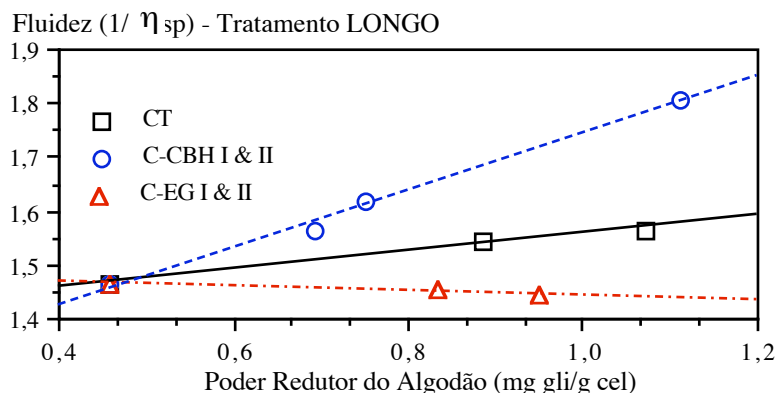


Figura IV.28 - Relação entre o poder redutor dos tecidos e o inverso da viscosidade específica (fluidez) de soluções de CED de celulose do algodão tratado com crudes de *T.reesei*.

#### 5.4 Índice de Cristalinidade

Popeline, Controlo	CT 240 min	C-CBH I & II 240 min	C-EG I & II 240 min	CT 6 dias	C-CBH I & II 6 dias	C-EG I & II 6 dias
0.83 (0%)	0.83 (2,3%)	0.83 (0,9%)	0.83 (1,8%)	0.83 (63%)	0.83 (3%)	0.83 (52%)

A extensão da hidrólise com celulasas, bem como a seu grau de aleatoriedade, não parecem afectar a cristalinidade das fibras de algodão (tab. IV.10). Isto sugere que a acção das celulasas, independentemente da sua composição, não é preferencial em regiões de maior ou menor cristalinidade. Este facto já foi relatado (73), tendo-se verificado também que, na hidrólise da celulose por celulasas brutas de *T.viride*, a cinética era de primeira ordem relativamente ao substrato (16). Isto sugere que a reactividade do substrato é uniforme, implicando a não alteração de cristalinidade, durante a hidrólise celulolítica.

## 5.5- Perda da Força de Rotura

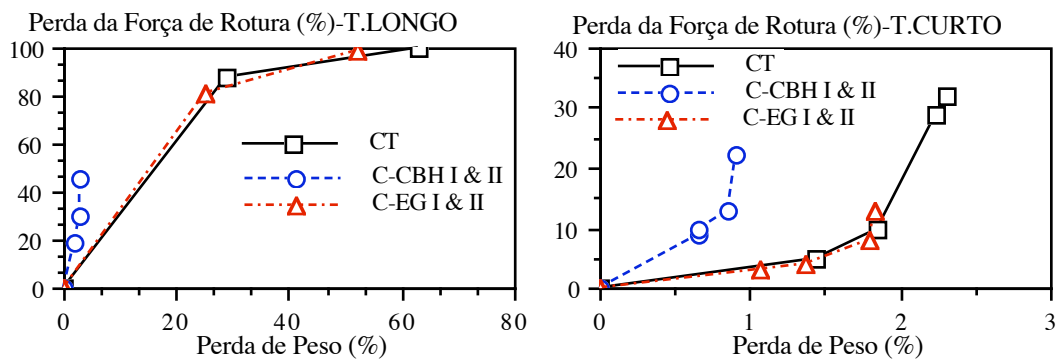


Figura IV.29 - Efeitos do tempo de tratamento com crudes de *T.reesei* na perda de força de rotura dos tecidos tratados.

Como se esperava, pelos resultados do ponto anterior, a maior acção aleatória "endo" de C-CBH I & II provoca uma maior perda de resistência com menor perda de peso (fig. IV.29). C-EG I & II não baixa a perda de resistência relativamente a CT, muito provavelmente devido à presença de acção residual "endo" por EG III e EG V.

## 5.6- Histerese do Movimento de Flexão dos Tecidos Tratados

Popeline, Controlo	CT 240 min	C-CBH I & II 240 min	C-EG I & II 240 min	CT 6 dias	C-CBH I & II 6 dias	C-EG I & II 6 dias
0.050	0.043	0.053	0.045	0.015	0.048	0.019

As pequenas alterações de 2HB (Tab. IV.11) nos tecidos tratados em tratamentos curtos, são devidos ao polimento e à remoção de material microfibrilar da superfície das fibras por CT e C-EG I & II. A acção "endo" de C-CBH I & II aumenta ligeiramente 2HB, por fibrilação à superfície, tal como sucedeu no tratamento com EG (SP492-PPC3617) estudado no ponto anterior. As maiores reduções de 2HB por CT e C-EG I & II, nos tratamentos longos, são consistentes com a grande perda de peso pela remoção substancial de material fibroso (fig. IV.25).

## 5.7- Estudos de Microscopia Electrónica de Alta Pressão

Foi gravada uma cassete vídeo sobre o comportamento de molhagem-inchamento e ou secagem-colapso das fibras de algodão tratadas e não tratadas. A hidrólise enzimática, depois duma certa extensão (> 25 % de perda de peso), altera o comportamento de secagem das fibras, praticamente não se observando o colapso das fibras tratadas. Isto sugere possíveis aplicações na fixação dimensional dos tecidos, a qual é dependente do processo de colapso das fibras durante a secagem dos mesmos.

## 6- PARÂMETROS CINÉTICOS E DE ADSORÇÃO RELATIVOS À HIDRÓLISE DO ALGODÃO COM CRUDES DE *TRICHODERMA REESEI*

Efectuaram-se estudos cinéticos e de adsorção sobre a popelina de algodão, com os crudes de mutantes de *T. reesei*, nos copos do Linitest. Pretendeu-se diferenciar, neste estudo, a acção dos crudes dos mutantes da *T. reesei*, nos dois níveis de acção mecânica (AFM e BFM) durante a hidrólise.

As relações cinéticas e de adsorção são mostradas nas figuras IV.30 e IV.31, respectivamente. As curvas dos diagramas foram calculadas por regressão não linear e os parâmetros calculados são apresentados na tabela IV.12. Os valores de  $V_{max}$  calculados são coerentes com os valores de actividade discutidos anteriormente. Como também já foi verificado, o aumento da fricção mecânica no tratamento aumenta  $V_{max}$  para todas as misturas celulolíticas.

As especificidades catalíticas também dão informações acerca do modo de acção hidrolítico das misturas celulolíticas. Um maior  $V_m/K_e$  indica que C-EG I & II tem uma acção mais específica do que C-CBH I & II, tendo CT um valor intermédio. Esta maior especificidade pode ser relacionada com a acção mais localizada de cisão contínua de celobiose nas extremidades do polímero. A acção mecânica aumenta a especificidade das enzimas, muito provavelmente porque aumenta o número de sítios onde a enzima "começa" a hidrólise, como é verificado pelo maior valor de  $E_m$ .

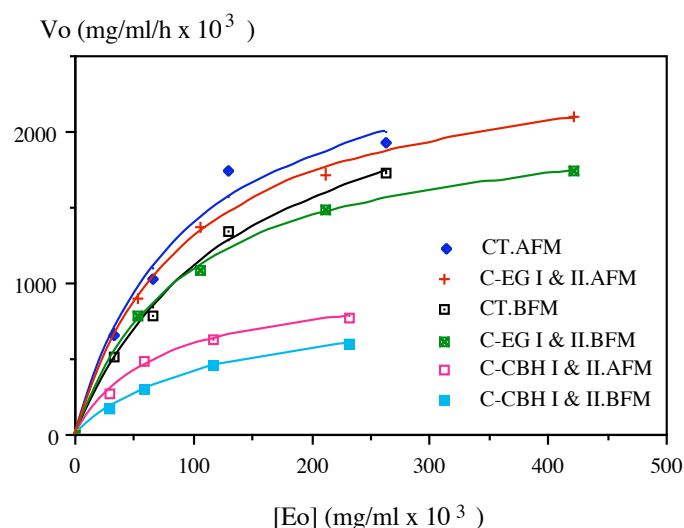


Figura IV.30 - Relação entre a velocidade inicial e a concentração inicial de enzima. BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

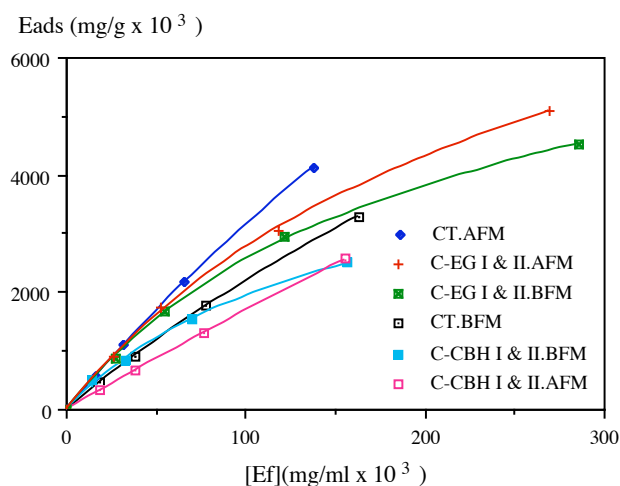


Figura IV.31 - Relação entre a enzima adsorvida e a concentração livre de enzima na solução. BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

O apagamento de CBH I & II, ou de EG I & II, parece aumentar a adsorção de celulase no substrato. Isto é coerente com o sinergismo competitivo observado por Woodward (47), entre EGs e CBHs. A maior fricção mecânica durante o tratamento diminui a adsorção, provavelmente porque aumenta o número de sítios livres onde a enzima pode actuar. Isto verifica-se especialmente para a mistura rica em actividade "endo", confirmando o sinergismo entre endoglucanases e a acção mecânica, já observado anteriormente.

TABELA IV.12 - Parâmetros Cinéticos e de Adsorção					
Enzima	$V_m$ (mg/ml.h)	$K_e$ (mg/ml)	$V_m/K_e$ (1/h)	$E_m$ (mg/g)	$K$ (ml/mg)
CT.BFM	$2,70 \pm 0,19$	$0,14 \pm 0,02$	$19,28 \pm 0,19$	$16,7 \pm 0,4$	$1,51 \pm 0,04$
CT.AFM	$2,74 \pm 0,34$	$0,10 \pm 0,03$	$27,40 \pm 0,34$	$24,5 \pm 0,2$	$1,47 \pm 0,02$
C-CBHs.BFM	$0,91 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,01$	$7,58 \pm 0,02$	$4,9 \pm 0,4$	$4,92 \pm 0,18$
C-CBHs.AFM	$1,01 \pm 0,04$	$0,07 \pm 0,01$	$14,43 \pm 0,04$	$47,3 \pm 9,9$	$0,37 \pm 0,08$
C-EGs.BFM	$2,15 \pm 0,05$	$0,10 \pm 0,01$	$21,50 \pm 0,05$	$7,8 \pm 0,2$	$4,92 \pm 0,18$
C-EGs.AFM	$2,56 \pm 0,07$	$0,10 \pm 0,01$	$25,60 \pm 0,07$	$10,1 \pm 0,3$	$3,77 \pm 0,20$

BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica, CBHs- CBH I & II, EGs- EG I &

II

## 7- TRATAMENTO DO ALGODÃO COM MISTURAS DE CRUDES DE *TRICHODERMA REESEI*

Foram feitas misturas com diferentes composições de C-CBH I & II e de C-EG I & II, comparando-se também a acção destas misturas com o crude total, CT. Pretendeu-se estudar o efeito da composição enzimática nos diversos processos de tratamento do algodão com celulases.

### 7.1-Perda de Peso

Na figura IV.32, mostra-se a perda de peso para as diferentes celulases usadas nos processos com alta e baixa fricção mecânica no Linitest a 50°C, no processo de simulação do tratamento *pad-batch* (por imersão das amostras no líquido de tratamento a 20°C) e posterior lavagem com alta fricção mecânica (AFM) sem enzima.

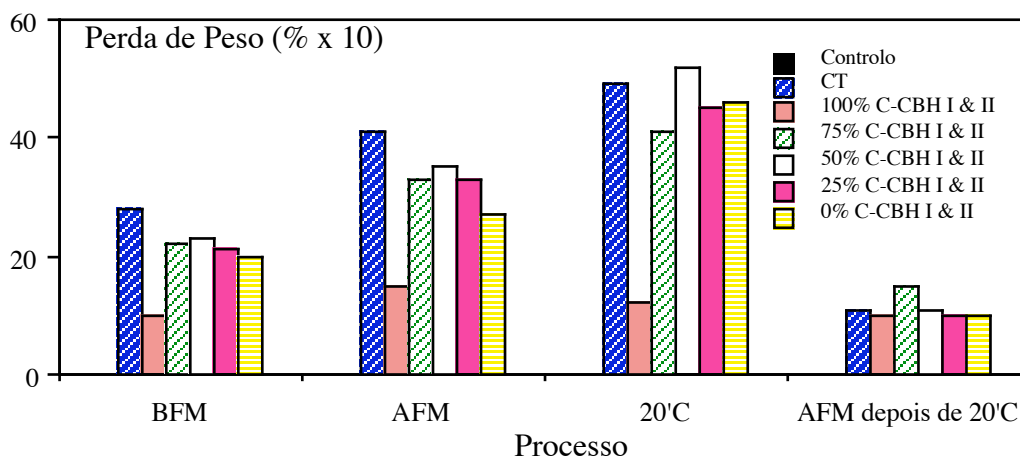


Figura IV.32- Perda de peso dos tecidos tratados para os diferentes processos. BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica, 20°C-Simulação de processo *pad-batch*, AFM depois de 20°C-Amostas tratadas em 20°C, lavadas com alta fricção mecânica sem enzima.

A perda de peso é geralmente menor para C-EG I & II e C-CBH I & II do que para as suas misturas (fig. IV.32). A mistura dos dois crudes que origina maior perda de peso nos tecidos é a composição com 50 % de cada um. Estes resultados mostram o sinergismo entre os crudes celulolíticos ricos em actividade EG e CBH, tal como descrito na literatura para os componentes purificados (45, 46, 47).

O aumento da acção da fricção mecânica, durante o processo de hidrólise, aumenta a perda de peso dos tecidos tratados (fig. IV.32). O processo efectuado sem qualquer acção mecânica, a 20°C, após três dias, origina uma perda de peso nos tecidos pouco superior a um processo de 30 min. a 50°C. Verifica-se, ainda, uma perda de peso apreciável para os tecidos tratados a 20°C, na lavagem com forte fricção mecânica.

A actividade relativa de C-CBH I & II, quando comparada com CT e C-EG I & II, é maior nos processos em que há acção mecânica e é menor no processo a 20°C (sem qualquer acção mecânica). A razão da perda de peso da lavagem AFM, sobre o processo a 20°C é maior para misturas ricas em EGs. Estes resultados confirmam o sinergismo esperado entre a actividade "endo" e a acção mecânica, sequencial ou simultaneamente.

A mistura a 50 % dos crudes modificados produz maior perda de peso que a celulase CT, somente para o tratamento a 20°C. Devido à pouca actividade de C-CBH I & II as misturas são feitas considerando o dobro deste crude, contendo assim todas as misturas uma maior actividade endo, sendo esta possivelmente, a razão da maior perda de peso encontrada.

### 7.2-Comprimento Médio dos Açúcares Hidrolisados

Comprimento Médio dos Açúcares Hidrolisados (x10)

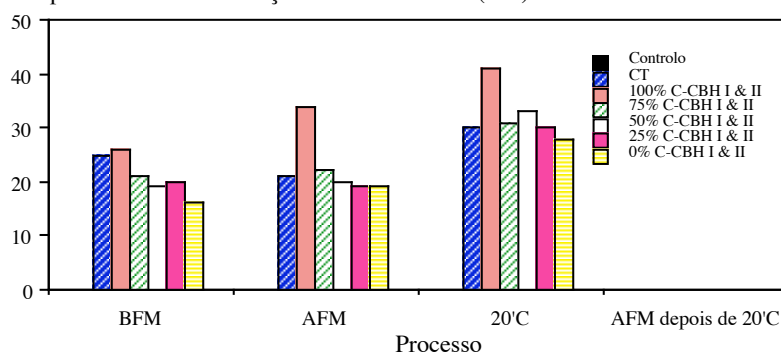


Figura IV.33- Comprimento médio dos açúcares hidrolisados para os diferentes processos. BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica, 20°C- Simulação de processo Pad-batch, AFM depois de 20°C- Amostas tratadas em 20°C, lavadas com alta fricção mecânica sem enzima.

O comprimento médio dos açúcares hidrolisados (fig. IV.33) é maior nos tratamentos com crudes mais ricos em actividade "endo", ou seja, com maior composição de C-CBH I & II, o que confirma a natureza das celulasas usadas e das suas misturas. O tratamento com maior acção mecânica origina açúcares mais compridos, especialmente para misturas ricas em actividade "endo". O processo efectuado sem acção mecânica a 20°C, é surpreendentemente, o que origina açúcares hidrolisados com maior comprimento, talvez pela pouca actividade "exo" (CBH) ou de celobiase a 20°C.

### 7.3-Poder Redutor do Algodão

O processo AFM relativamente ao BFM, aumenta o poder redutor devido à acção mecânica, que cria maior número de "sítios" onde a celulase pode atacar (fig. IV.34). Por vezes, o tratamento BFM diminui o poder redutor, por remoção das cadeias já partidas durante o branqueamento prévio do tecido. O tratamento longo de três dias produz maior número de extremidades reductoras, que podem ser facilmente removidas após uma lavagem AFM sem enzima. A perda de peso produzida na lavagem AFM sem enzima e a diminuição do poder redutor após esta mesma lavagem, sugerem que a acção da celulase pode enfraquecer a estrutura da celulose, a qual pode assim ser mais facilmente removida, após uma lavagem forte. Isto parece dever-se à actividade da C-EG I & II (fig. IV.34).

Poder Redutor do Algodão (mg glic./g cel. x 10<sup>3</sup>)

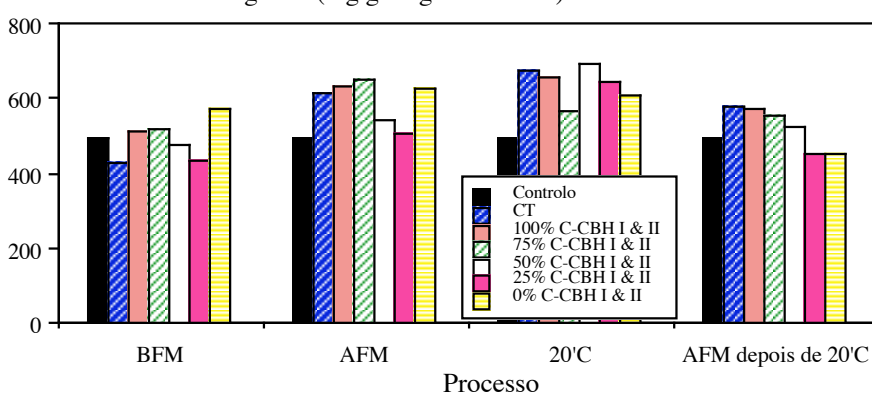


Figura IV.34- Poder redutor de algodão tratado nos diferentes processos. BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica, 20°C- Simulação de processo Pad-batch, AFM depois de 20°C- Amostas tratadas em 20°C, lavadas com alta fricção mecânica sem enzima.

### 7.4 -Perda da Força de Rotura

Nos processos BFM e AFM verifica-se um maior sinergismo, para a composição com 50 % de ambos os crudes, medida como perda da força de rotura em % (fig. IV 35 a). A acção "endo" e a fricção mecânica são os factores responsáveis pela perda de resistência dos tecidos tratados, tal como é verificado na figura IV.35 b). O aumento da acção mecânica vai aumentar o número de pontos onde a celulase pode atacar, especialmente a EG, pelo que se verifica que o processo AFM tem maior perda da força de rotura nos tecidos tratados. A lavagem AFM dos tecidos tratados a 20°C vai diminuir a razão perda de resistência/perda de peso total para o tecido tratado com mistura rica em EGs, aumentando esta razão para os tecidos tratados com misturas ricas em CBHs. A acção das CBHs parece deixar a estrutura do algodão

enfraquecida, tal como sugerido no ponto anterior, causando maior perda de resistência após a remoção de material fibrilar por uma lavagem com forte acção mecânica.

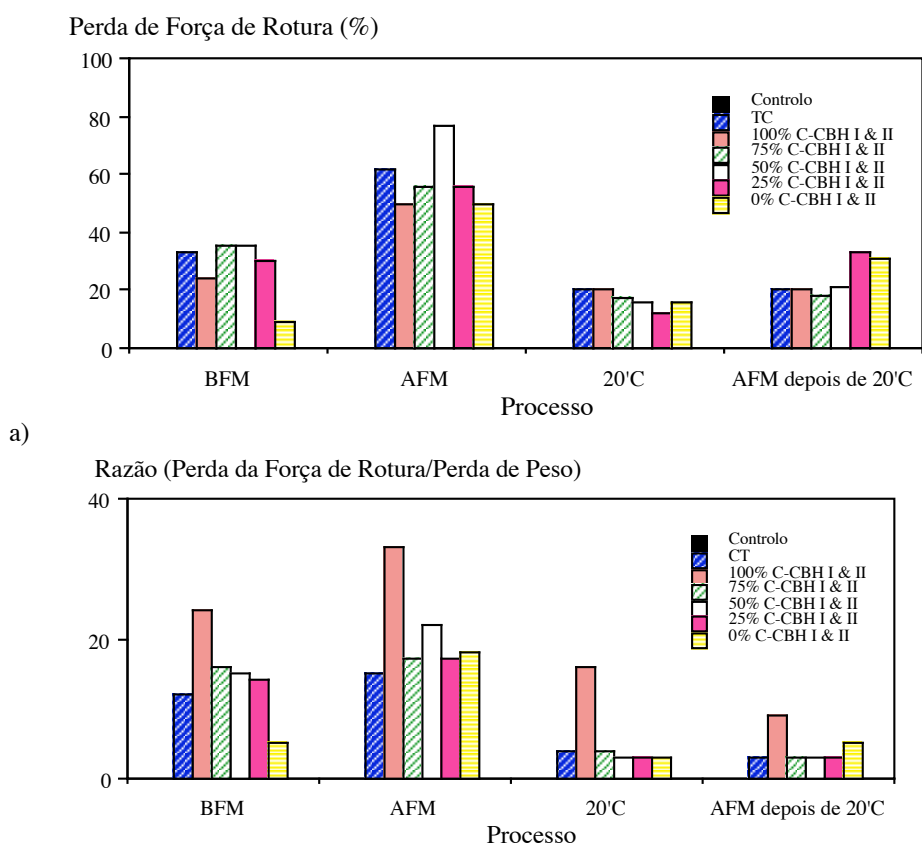


Figura IV.35- a) Perda da força de rotura nos tecidos tratados nos diferentes processos. b) Razão da perda da força de rotura sobre a perda de peso nos tecidos tratados nos diferentes processos. BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica, 20°C- Simulação de processo Pad-batch, AFM depois de 20°C- Amostas tratadas em 20°C, lavadas com alta fricção mecânica sem enzima.

### 7.5-Fotografias de Microscopia Electrónica e Histerese de Flexão dos Tecidos Tratados

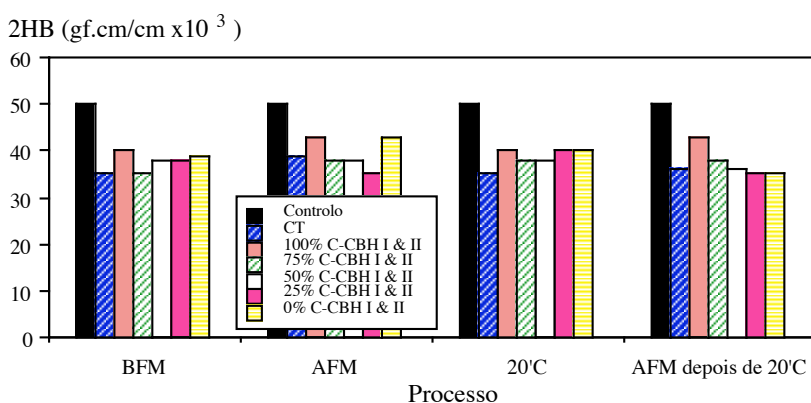


Figura IV.36- Histerese de flexão dos tecidos tratados nos diferentes processos. BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica, 20°C- Simulação de processo Pad-batch, AFM depois de 20°C- Amostas tratadas em 20°C, lavadas com alta fricção mecânica sem enzima.

O tratamento com celulasas diminui a histerese de flexão dos tecidos (fig IV.36) como se esperava, sendo este decréscimo maior para CT e para as misturas dos crudes celulolíticos. A lavagem AFM diminui 2HB, especialmente para o tecido tratado com C-EG I & II, enquanto que para o tecido tratado com C-CBH I & II, o valor de 2HB aumenta ligeiramente. Este aumento é devido à desfibrilação (fig.

IV.37- comparar i) com j)), aumentando a fricção inter-fibras. A diminuição de 2HB nos tecidos tratados com celulase rica em actividade "exo" é devida à maior limpeza das fibras durante a lavagem AFM, como se confirma pelas fotografias da figura IV.37 (comparar l) com m) e n) com o)).

Todos os outros tecidos não mostram alterações significativas após o tratamento celulolítico relativamente ao tecido não tratado, com excepção dos tecidos lavados no processo AFM (fig. IV.37).

*Figura IV.37 - Fotografias de microscopia electrónica de varrimento dos tecidos tratados. a) Fibras do tecido tratado com o crude total, CT, a 50°C, durante 30 minutos no Linitest com baixa fricção mecânica. b) Fibras do tecido tratado com o crude total, CT, a 50°C, durante 30 minutos no Linitest com alta fricção mecânica. c) Fibras do tecido tratado com C-EG I & II, a 50°C, durante 30 minutos no Linitest com baixa fricção mecânica. d) Fibras do tecido tratado com C-EG I & II, a 50°C, durante 30 minutos no Linitest com alta fricção mecânica. e) Fibras do tecido tratado com C-CBH I & II, a 50°C, durante 30 minutos no Linitest com baixa fricção mecânica. f) Fibras do tecido tratado com C-CBH I & II, a 50°C, durante 30 minutos no Linitest com alta fricção mecânica. g) Fibras do tecido não tratado. h) Fibras do tecido lavado com alta fricção mecânica, com água a 50°C, durante 60 minutos. i) Fibras do tecido tratado com o crude total, CT, a 20°C, durante 3 dias num matraz. j) Fibras do tecido lavado com alta fricção mecânica, com água a 50°C, durante 60 minutos (tecido pré-tratado como indicado em i)). l) Fibras do tecido tratado com C-EG I & II, a 20°C, durante 3 dias num matraz. m) Fibras do tecido lavado com alta fricção mecânica, com água a 50°C, durante 60 minutos (tecido pré-tratado como indicado em l)). n) Fibras do tecido tratado com C-CBH I & II, a 20°C, durante 3 dias num matraz. o) Fibras do tecido lavado com alta fricção mecânica, com água a 50°C, durante 60 minutos (tecido pré-tratado como indicado em n)).*

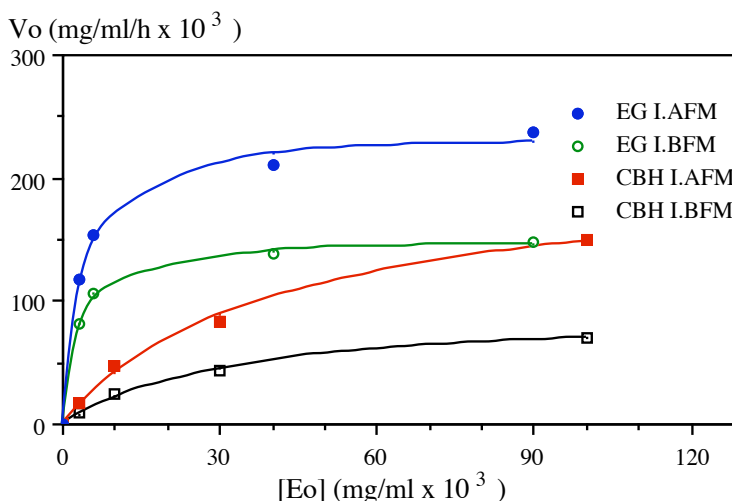
*Para ver as fotos da figura IV.25, ver o artigo (que também existe no repositório)*

**Cavaco-Paulo, L. Almeida, D. Bishop, CELLULASE ACTIVITIES AND FINISHING EFFECTS, Textile Chemist & Colorist, June 1996, 28-32**

#### 8- A ACÇÃO DE EG I E CBH I, DA *TRICHODERMA REESEI*, NO ALGODÃO

Os tecidos de popelina foram tratados com diversas concentrações de EG I e de CBH I, purificados do crude produzido pela *T. reesei*, com dois níveis de acção mecânica. Pretendeu-se diferenciar a acção destes componentes celulolíticos no algodão.

##### 8.1- Açúcares Redutores Totais e Aplicação do Modelo Cinético



*Figura IV.38- Relação entre a velocidade inicial e a concentração inicial de enzima*

Na figura IV.38 mostra-se a relação entre a velocidade inicial de reacção e a concentração da enzima. As curvas do diagrama são obtidas por regressão não linear e os parâmetros cinéticos calculados, estão descritos na tabela IV.13.

TABELA IV.13 -Parâmetros Cinéticos Calculados			
Enzima	Vmax(mg/ml/h)	Ke(mg/ml)	Vmax/Ke(1/h)
CBH I.BFM	0,093 ± 0,004	0,0316 ± 0,0037	2,943 ± 0,004



CBH I.AFM	$0,207 \pm 0,014$	$0,0397 \pm 0,0062$	$5,214 \pm 0,014$
EG I.BFM	$0,150 \pm 0,002$	$0,0025 \pm 0,0001$	$60,000 \pm 0,002$
EG I.AFM	$0,237 \pm 0,007$	$0,0032 \pm 0,0004$	$74,063 \pm 0,007$

Nas condições de processamento usadas, a celulase EG I é mais activa que a CBH I ( $V_{max}$ , tab. IV.13). Interpretando  $K_e$  como uma constante aparente de dissociação, os valores ( $K_e$ ) sugerem que EG I se liga mais fortemente à celulose do que CBH I e que acção mecânica aumenta a extensão da hidrólise, aumentando os processos de desadsorção das celulases.

### 8.2- Poder Redutor e Fluidiez de Soluções CED dos Tecidos Tratados

A relação entre o poder redutor e a fluidiez das soluções CED de celulose tratada é mostrada na figura IV.39. Nestes diagramas, o declive indica o grau de aleatoriedade da acção hidrolítica. Como se esperava, EG I tem uma acção hidrolítica mais aleatória do que CBH I. O aumento da acção mecânica no tratamento vai aumentar a acção aleatória de CBH I e vai diminuir a acção aleatória de EG I. A acção mecânica cria mais "sítios" onde a enzima pode atacar, significando para CBH I, uma acção mais aleatória e para EG I, uma acção menos aleatória (mais "sítios" acessíveis, que se tornam mais localizados do "ponto de vista" de EG I).

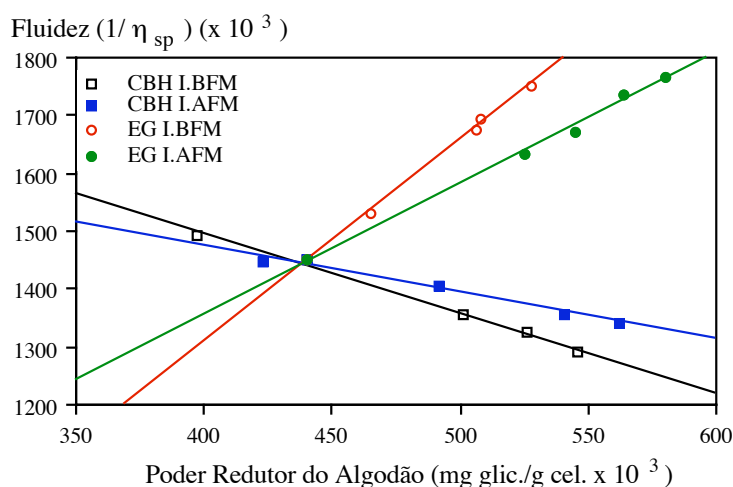


Figura IV.39- Relação entre o poder redutor e a fluidiez das soluções CED de celulose tratada com EG I e CBH I

## 9- TRATAMENTO DO ALGODÃO COM COMPOSIÇÕES DE EG I E CBH I DE TRICHODERMA REESEI

Tratou-se a popelina de algodão com misturas de diferentes composições de CBH I e EG I, pretendendo estudar o efeito da composição enzimática nos níveis BFM e AFM.

### 9.1- Perda de Peso e Açúcares Redutores

A composição, à qual o sinergismo é máximo é de 60-80% para CBH I e de 40-20% para EG I (fig. IV.40-43), o que corresponde à composição dos componentes classificados como CBHs e como EGs, respectivamente nas misturas brutas (34). A agitação mecânica tem uma acção cooperativa em toda a gama de composições de EG I com CBH I. O grau de sinergismo, medido como perda de peso, é semelhante para ambos os processos AFM e BFM (fig. IV.41). No entanto, o grau de sinergismo, quando medido como açúcares redutores totais, é sempre superior para o processo BFM (fig. IV.43). Isto significa que o comprimento dos açúcares hidrolisados é maior para o processo AFM, como se pode observar na figura IV.44. De facto, verificou-se em todos os processos AFM, excepto quando se têm CBH I a 100%, um depósito de algodão no fundo do copo Linitest de tratamento.



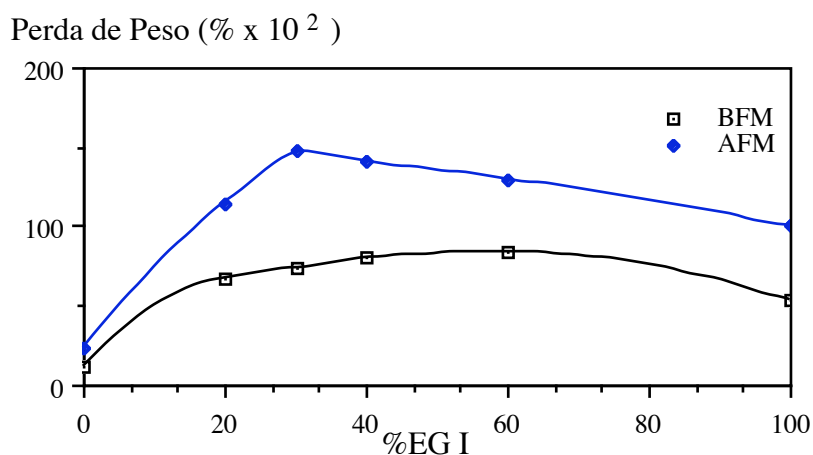


Figura IV.40 - Relação entre perda de peso e composição da mistura de EG I e CBH I. BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

O grau de sinergismo (GS), foi calculado pela expressão:

$$GS = P(x) / [P(1) \cdot x + P(0) \cdot (1-x)]$$

em que P(x) é valor do parâmetro P na composição x de EG I.

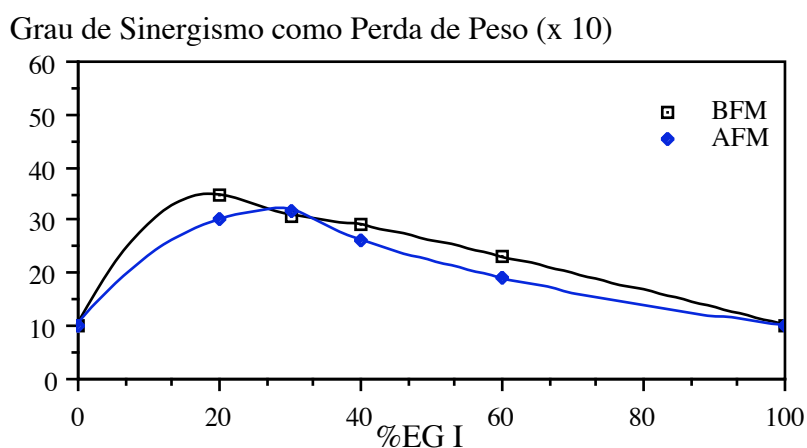


Figura IV.41- Relação entre grau de sinergismo como perda de peso e composição da mistura de EG I e CBH I. BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

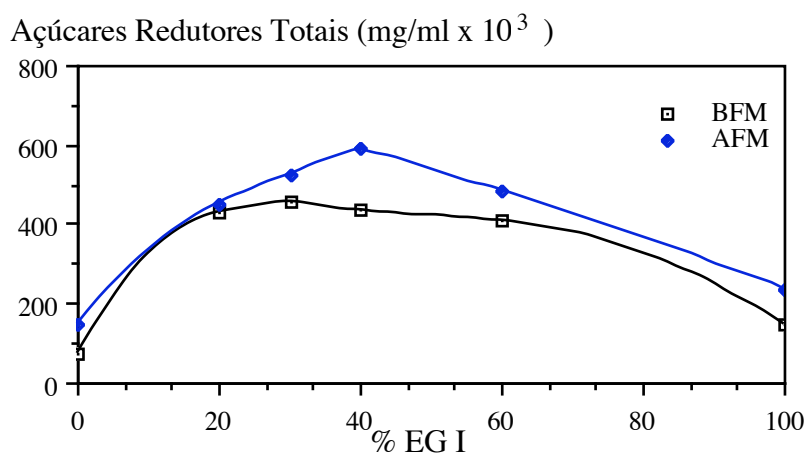


Figura IV.42 - Relação entre açúcares redutores totais e composição da mistura de EG I e CBH I. BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

Grau de Sinergismo como Açúcares Redutores Totais (x 10)

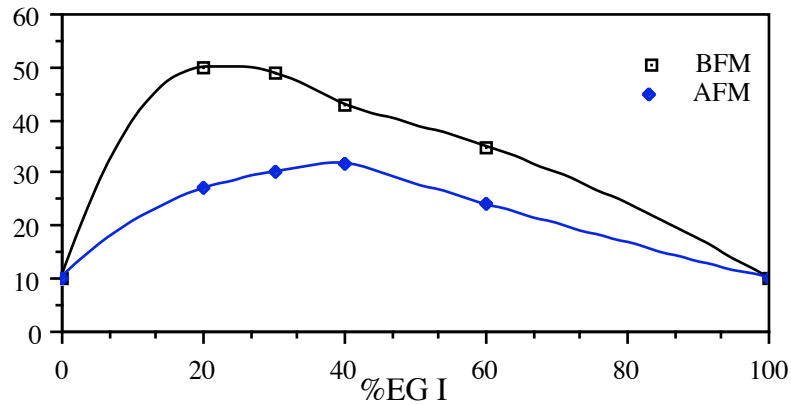


Figura IV.43 - Relação entre grau de sinergismo como açúcares redutores totais e composição da mistura de EG I e CBH I. BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

Comprimento Médio dos Açúcares Hidrolisados (x 10)

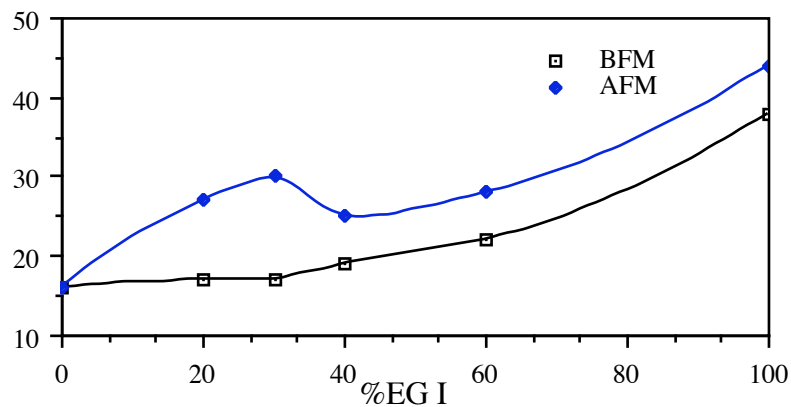


Figura IV.44 - Relação entre comprimento médio dos açúcares hidrolisados e composição da mistura de EG I e CBH I. BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

O aumento da composição em EG I nas misturas origina açúcares mais compridos em ambos os processos BFM e AFM, confirmando a acção clássica "endo" (fig. IV.44).

### 9.2-Poder Redutor do Algodão

Poder Redutor do Algodão (mg glic./g cel x 10<sup>3</sup>)

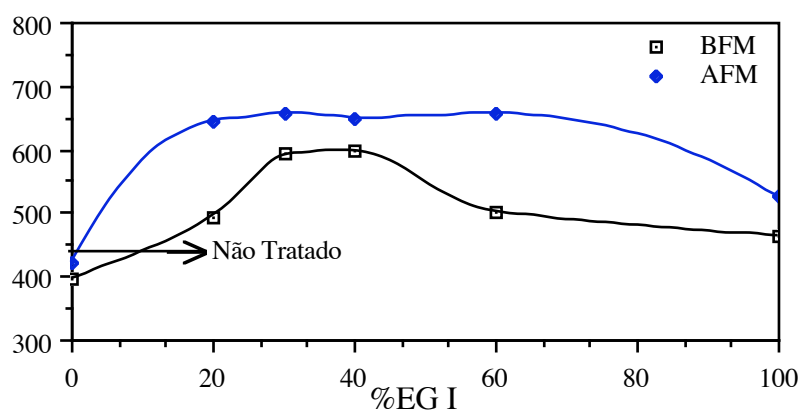


Figura IV.45 - Relação entre o poder redutor dos tecidos tratados e composição da mistura de EG I e CBH I. BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

O sinergismo máximo entre EG I e CBH I é verificado, também, a 60-80 % de CBH I, quando medido como o poder redutor dos tecidos tratados (fig. IV.45). Verifica-se também que a acção mecânica

aumenta o poder redutor dos tecidos tratados em toda a gama de composições da mistura. A fricção mecânica cria mais "sítios" onde a enzima pode atacar, aumentando assim o número de extremidades hidrolisadas e o poder redutor do algodão tratado. A composição com 100% de CBH I diminui o poder redutor do tecido tratado, porque remove as cadeias partidas da superfície das fibras de algodão branqueado. De notar, que o branqueamento produz alguma degradação, formando extremidades redutoras à superfície da fibra.

### 9.3-Perda da Força de Rotura

O aumento de EG I na composição da mistura origina uma maior perda de resistência, verificando-se uma acção cooperativa com a agitação mecânica. A acção mecânica aumenta a perda de resistência em toda a gama de composições (fig. IV.46).

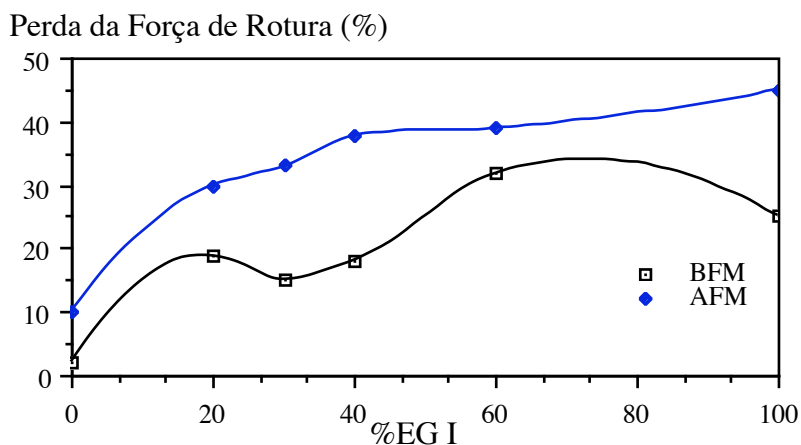


Figura IV.46 - Relação entre a perda da força de rotura dos tecidos tratados e a composição da mistura de EG I e CBH I. BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

### 9.4-Fotografias de Microscopia Electrónica e Histerese de Flexão dos Tecidos Tratados

Devido à pouca perda de peso no processo BFM, a 2HB dos tecidos tratados não é alterada. O processo AFM altera os valores de 2HB dependendo da composição (fig. IV.47). Quando o sinergismo é máximo entre EG I e CBH I (60-80 % de CBH I) observa-se redução de 2HB, devido à remoção de material fibrilar por ambas as enzimas (fig. IV.48). O tratamento AFM com 100% de EG I leva à formação de fibrilas na superfície das fibras (fig. IV.48), aumentando o valor de 2HB.

As fotografias de Microscopia Electrónica mostram poucas alterações à superfície das fibras, para o processo BFM (fig. IV.48). No processo AFM, só se verificam alterações nas fibras para tratamentos com composições de 30 e 100% de EG I, que confirmam as alterações nos valores de 2HB (fig. IV.48).

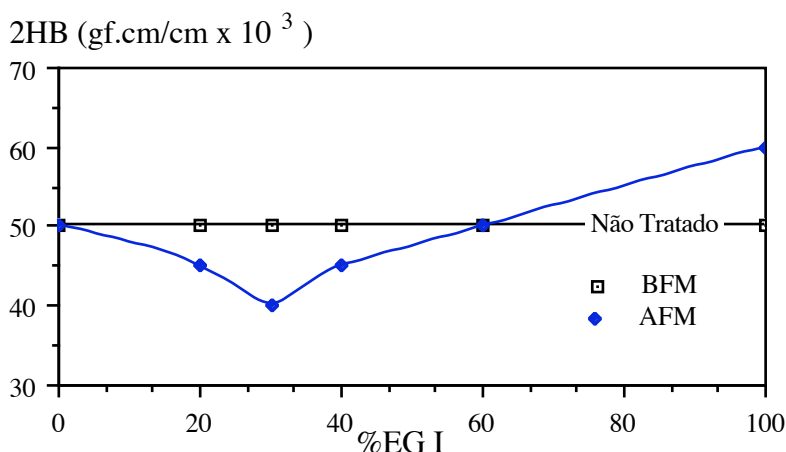


Figura IV.47 - Relação entre a histerese de flexão dos tecidos tratados e a composição da mistura de EG I e CBH I. BFM- Baixa Fricção Mecânica, AFM- Alta Fricção Mecânica.

### 1- CARACTERIZAÇÃO DAS CELULASES USADAS

O conhecimento da composição da mistura celulolítica é o factor mais importante para a correcta interpretação dos valores dos parâmetros de controlo do tratamento enzimático do algodão. A análise das metodologias existentes para a caracterização das celulases foi feita em II.2.2. A base destas metodologias é essencialmente empírica e tem sido alvo de acesa discussão nas duas últimas décadas (8, 22, 29, 30, 95, 96).

Neste trabalho verificou-se que, por exemplo, a mistura C-EG I & II é mais activa em CMC, CAIAF e celobiose, sendo o crude total, CT, mais activo sobre o algodão (IV.1). Isto indica que se deve ter bastante cuidado na interpretação dos resultados das actividades enzimáticas, com base em substratos modelo. A comparação das actividades de Cellusoft L com Denimax T e EG (SP492-PPC3617) deve ter sempre em conta que, os ensaios se realizaram a valores de pH diferentes, 5 e 7, respectivamente. Todos estes aspectos "balançam" o suporte experimental da análise feita em IV.1.

A investigação mais "fundamental" desenvolvida pelos laboratórios de empresas produtoras de enzimas incide essencialmente nas celulases da *T. reesei* e da *H. insolens* (42, 44, 49, 97). Verificou-se experimentalmente que as CBHs altamente purificadas destes sistemas fúngicos (37, 38, 49) não eram activas em CMC, podendo tomar-se a actividade neste derivado da celulose como actividade efectiva em endoglucanase. A comparação relativa dos valores das actividades medidas nos substratos modelo, em conjunto com outros parâmetros medidos directamente durante o tratamento enzimático do algodão, completa o conhecimento da actividade real de cada mistura celulolítica usada.

A comparação de Cellusoft L com Denimax T é inevitável, apesar de terem pHs de actuação diferentes, já que são enzimas-tipo usadas nas duas aplicações industriais mais frequentes. É, assim, essencial estabelecer a diferença entre estes dois produtos. A maior actividade de Cellusoft L, relativamente à Denimax T, é evidente em todos os substratos e em todos ensaios efectuados (IV.1, IV.2, IV.3). A maior actividade relativa "endo" de Denimax T é devida à maior actividade relativa em CMC (IV.1). O aumento do valor de 2HB dos tecidos tratados no processo AFM (IV.3) também indicia a actividade "endo", segundo os resultados obtidos neste trabalho (IV.4, IV.9). No entanto, Denimax T possui também alguma actividade "exo", quer pela considerável actividade em CAIAF e no algodão, quer por produzir açúcares relativamente curtos nos tratamentos do algodão (IV.1, IV.2).

A EG (SP492-PPC3617) é designada como tal (endoglucanase) pelo seu fornecedor e mostra só ter actividade sobre CMC e celulose amorfa (IV.1). Apesar de EG não ter actividade sobre o algodão, medida como açúcares solúveis, esta actividade de EG pode, no entanto, ser verificada pela formação de extremidades redutoras no algodão (IV.4). A EG também coopera sinergicamente com a alta fricção mecânica produzindo perda de peso, sem a formação de açúcares redutores solúveis (IV.4). A actividade da EG no algodão, nos dois níveis de acção mecânica usados, é a prova de que os métodos clássicos que se baseiam só na medição dos substratos modelos podem ser insuficientes para a determinação da actividade real duma celulase. Estes resultados sugerem que a EG possa ser uma celulase sem CBD, como o descrito em II.2.

A informação fornecida (Primalco, Ltd.) acerca dos crudes de *T. reesei*, facilitou a interpretação dos resultados obtidos na hidrólise do algodão com estas celulases. A actividade nos substratos modelo já indicia a maior actividade "endo" de C-CBH I & II e a maior actividade "exo" de C-EG I & II relativamente à CT (IV.1). A hidrólise longa do algodão com estas celulases vem clarificar a importância de EG III e EG V que, em cooperação com CBH I e CBH II na mistura C-EG I & II, solubilizam quase por completo o algodão (IV.5). A EG III e EG V representam percentagens muito pequenas em todo crude sintetizado pela *T. reesei* (37, 38). Este resultado é coerente com uma publicação recente em que basta uma diferença de cerca de 0.4 % para 0.008 % de contaminação de endoglucanase, para dobrar a actividade duma celobiohidrolase purificada (> 99,5 %) (37, 98). O declive da recta da relação entre a fluidez de soluções CED e o poder redutor dos algodões tratados, confirma a aleatoriedade das actividades "endo" e "exo" das três misturas celulolíticas (IV.5). A acção mais aleatória "endo" é a responsável pela perda de resistência dos tecidos tratados com celulases (IV.5, IV.7). As actividades relativas das celulases são totalmente diferentes nos tratamentos, quando se varia o nível de fricção mecânica aplicado (IV.7). Isto sugere que a fricção mecânica não pode ser negligenciada no estudo do processamento do algodão com celulases, podendo ser um factor importante na obtenção de novos efeitos de acabamento.

A actividade de EG I e CBH I purificados da *T. reesei* não foi medida por já se encontrar descrita na literatura (8, 37, 38, 45). A EG I é mais activa do que a CBH I, sobre o algodão, nas condições experimentais descritas, ao contrário do que se poderia esperar pelos resultados anteriores com crudes de *T. reesei* (IV.8, IV.9). A relação entre a fluidez de CED com o poder reductor dos algodões tratados confirma a grau de aleatoriedade da acção de EG I, relativamente à CBH I e a influência da acção mecânica na acção hidrolítica destas enzimas (IV.8). A actividade "endo" de EG I é confirmada pela produção de açúcares redutores mais compridos (IV.9) relativamente aos produzidos pela CBH I. O sinergismo máximo das misturas de EG I e CBH I é encontrado para composições de cerca de 60-80% de CBH I, o que corresponde à percentagem das CBHs no crude original de *T. reesei* (34) (IV.5).

Os resultados obtidos com EG I e CBH I purificados de *T. reesei* devem ser interpretados com algum cuidado, já que são resultado de um único ensaio, devido à quantidade de enzima obtida. No entanto, na maior parte dos ensaios efectuados com as enzimas purificadas, confirmam-se algumas observações e indicações sugeridas por resultados obtidos neste trabalho com outras celulasas.

## 2- ESTUDOS CINÉTICOS E DE ADSORÇÃO

O estudo cinético e de adsorção durante o processamento do algodão com celulasas, fornece importantes informações mecanísticas acerca da hidrólise nas condições reais do tratamento industrial.

A aplicação do modelo discutido em II. 3.2 implica o cálculo da velocidade inicial  $V_0$ . O facto da hidrólise enzimática da celulose cristalina ser bastante lenta, facilita a medição experimental da velocidade de reacção inicial. Na maior parte dos casos, para a hidrólise de celulosas cristalinas, considera-se 30-60 minutos como o tempo suficiente para a determinação de  $V_0$  (46, 57, 99), sendo linear, neste intervalo de tempo, a relação tempo-substrato convertido (46). Existe mesmo um trabalho publicado em que a medição de  $V_0$  é feita após 20 horas de hidrólise (55). Os resultados experimentais em IV.4 não mostram linearidade na conversão do algodão por Cellusoft L, entre 30-120 minutos de tratamento. Apesar desta evidência, a equação do modelo cinético discutida em II.3.2 é válida experimentalmente para a conversão em todos os tempos de reacção e não só no início (57). Em todos estes tempos de reacção  $K_e$  e  $V_{max}$  dão uma informação semelhante, embora referida ao tempo de conversão  $t$ . Este aspecto é desejável, já que se pretendem comparar  $V_{max}$  e  $K_e$  para diferentes enzimas em diferentes processos. Em livros de texto, considera-se que  $V_0$  tem que ser relativo a uma conversão inferior a 5% (21); como 30-60 minutos de hidrólise celulolítica do algodão no Linitest (com as concentrações de enzima usadas) dão uma perda de peso inferior a 5%, pode-se usar este valor de  $V_0$  na discussão.

A adsorção, durante a hidrólise da celulose por celulasas, é um processo dinâmico de não-equilíbrio, em que a enzima ao ser adsorvida no substrato o vai hidrolizar de seguida. Foram feitas tentativas para resolver este problema, nomeadamente, estudando a adsorção a temperaturas baixas ( $\approx 4-5^\circ\text{C}$ ) (37, 38, 52) ou procedendo a estudos de adsorção com outras proteínas não hidrolíticas na celulose (100). Verificou-se também que a reversibilidade da adsorção das celulasas em substratos cristalinos não é total (55), ficando grande quantidade de enzima ligada à celulose após eluição com água. Apesar destes factores, verifica-se boa concordância do modelo de Langmuir com os resultados experimentais de adsorção para componentes puros e para CBDs (35, 55), o que sugere que após curtos períodos de incubação, se pode negligenciar a hidrólise do substrato. Nos estudos efectuados, verificou-se que a agitação mecânica tende a diminuir a adsorção, favorecendo o possível equilíbrio ao fim de 30 minutos, podendo-se negligenciar a hidrólise ocorrida neste período de tempo.

Os resultados cinéticos obtidos, para as diferentes celulasas usadas, confirmam o que foi observado para as medidas de actividade das enzimas. As medidas de adsorção (IV.6) para C-EG I & II e C-CBH I & II quando comparadas com CT parecem confirmar o tipo de sinergismo competitivo entre as actividades "exo" e "endo" observado na literatura (45, 47).

Em termos gerais, a acção mecânica durante o processo de hidrólise aumenta o número de "sítios" livres onde a enzima pode actuar (IV.6), diminuindo a adsorção no substrato.

## 3- A ACÇÃO MECÂNICA NOS PROCESSOS DE HIDRÓLISE COM CELULASES

A acção mecânica coopera na hidrólise celulolítica do algodão, aumentando a extensão da degradação produzida (IV).

A fricção mecânica nos processos de hidrólise aumenta o comprimento dos açúcares hidrolisados verificando-se, na maior parte dos ensaios AFM, a formação de um depósito de pó de algodão, devido à presença dos discos de aço no copo de tratamento (IV). A fricção mecânica exercida nos tecidos durante os tratamentos, só por si, não provoca perda de peso, como foi verificado nos ensaios de controlo AFM no Linitest e na máquina de lavar Wascator Fom 71.

Os processos AFM, em acção cooperativa com as celulasas, são também os mais eficazes para sectionar fibras e eliminar a pelagem da superfície dos tecidos (IV.2, IV.3).

No capítulo IV.4, observa-se que a acção mecânica durante os tratamentos dá ênfase à actividade "endo" em detrimento da actividade "exo". Verifica-se nos capítulos IV.5 e IV.7 que a actividade "endo" é a responsável pela perda de resistência dos tecidos. Entende-se, assim, que a razão perda da força de rotura/perda de peso seja superior para processos com maior acção mecânica, nos tecidos em IV.7. O tratamento por celulases sem qualquer acção mecânica, apesar de produzir maior perda de peso, é o que produz menor perda de resistência dos tecidos (IV.7). Este resultado sugere a possibilidade dum tratamento tipo *pad-batch*, com o objectivo de se obter uma perda de peso apreciável, aumentando a flexibilidade dos tecidos, com perdas mínimas de resistência.

A acção mecânica coopera sinergicamente com as celulases na hidrólise da celulose: desadsorve as enzimas do substrato, deixa-as livres para a hidrólise e aumenta a superfície de contacto na celulose do algodão, por desfibrilação superficial (IV.6, IV.7). Esta acção sinérgica com a acção mecânica é maior para a actividade "endo" (IV.4, IV.6) pela criação de maior número de pontos (ou "superfície fresca") onde a enzima pode actuar. Esta parece ser a explicação mais plausível para as diferentes actividades relativas entre CT, C-EG I & II e C-CBH I & II, quando se altera o nível de acção mecânica do tratamento. A razão da perda de peso com a EG I entre os dois níveis de acção mecânica é superior à razão da perda de peso para CBH I (IV.9), confirmando os resultados anteriores.

Os tecidos pré-tratados com celulases podem ainda sofrer uma perda de peso considerável ao serem submetidos a uma lavagem AFM. Se esta perda de peso for comparada com a perda de peso no pré-tratamento, verifica-se que também é o tecido pré-tratado com celulase rica em EGs que tem maior percentagem de perda de peso na lavagem AFM.

A lavagem AFM reduz o poder redutor e aumenta a perda de resistência dos tecidos pré-tratados, em maior extensão para C-EG I & II do que para outras composições (IV.7). A actividade em CBH parece assim ter um papel importante no enfraquecimento da estrutura da celulose que, após uma lavagem AFM pode ser degradada. Este facto necessita, contudo, de confirmação experimental com componentes celulolíticos purificados.

O facto do poder redutor dos tecidos lavados ser reduzido, relativamente à situação do pré-tratamento, indica que as extremidades reductoras poderão ser as mais facilmente removidas. Este resultado é particularmente interessante já que abre perspectivas para novas aplicações celulolíticas, em especial, para processos tipo *Stone-Wash*, em que o tecido pode ser pré-tratado com celulases obtendo-se o efeito "usado" por lavagem posterior, com menor perda de resistência. Esta sequência parece ser a mais correcta, já que a lavagem com celulase, após a acção mecânica (do grau que se encontra nas máquinas de lavar) não produz qualquer de perda de peso suplementar (101).

O declive da relação entre o poder redutor e a fluidez das soluções CED de celulose tratada por EG I e CBH I, nos processos BFM e AFM, indica o grau de aleatoriedade da acção hidrolítica (IV.8). Como se esperava, a EG I tem uma acção hidrolítica mais aleatória do que a CBH I. O aumento da acção mecânica no tratamento vai aumentar a acção aleatória da CBH I e diminuir a da EG I. Como a acção mecânica cria mais "sítios" onde a enzima pode atacar, o efeito vai ser oposto: mais "sítios" para CBH I, significa uma acção mais aleatória, enquanto que mais "sítios" para EG I, significa mais "sítios" acessíveis, que são mais localizados, reduzindo a aleatoriedade deste componente.

#### 4- SUBSTRATOS TRATADOS

Nos substratos tratados, mediu-se o poder redutor, a viscosidade das soluções CED, a cristalinidade, o grau de "pilling", a força de rotura e as propriedades mecânicas relacionadas com o toque (sistema KES-F e Alambeta).

A perda de resistência, o poder redutor e a fluidez foram já discutidos nos pontos anteriores.

##### 4.1- Cristalinidade

A cristalinidade após o tratamento não é alterada significativamente, quer se esteja em presença de tratamentos longos ou curtos, com ou sem acção mecânica e qualquer que seja a composição da enzima, tal como observado anteriormente (22, 29, 73, 79). O facto da cinética da hidrólise do algodão por um crude de *T. viride* ser de 1ª ordem (16), sugere que a reactividade do substrato durante a degradação é uniforme, não se alterando a cristalinidade. Isto sugere, como já foi discutido em IV.5.4, que a acção celulolítica não é preferencial em regiões de maior ou menor cristalinidade. Tem havido intensa discussão sobre se o algodão é bifásico (fase cristalina e fase amorfa) ou monofásico (uma fase cristalina com diversos graus de imperfeição) (102). A acessibilidade do algodão, descrita pelo modelo de Rowland em II.1.4 é válida considerando qualquer uns dos modelos de substrato bifásico ou monofásico (103). Poderá especular-se, neste trabalho, a hipótese de que o ataque enzimático no algodão monofásico suceda nas imperfeições da estrutura, não alterado a sua cristalinidade (16).

##### 4.2- Parâmetros Mecânicos dos Tecidos Tratados

O estudo feito (IV.3) aos dados dos parâmetros mecânicos dos tecidos tratados baseia-se numa técnica de redução de dados. A análise multivariada por componentes principais (87, 90) depende da opinião de quem trata os dados, questionando-se qual a percentagem inicial de informação que poderá ser

desprezada para reduzir ao mínimo o número de factores considerados. O objectivo inicial era diferenciar os tecidos pelos valores das suas propriedades mecânicas. A observação das tabelas dos dados de cada tecido permite ter uma ideia dessa diferença, mas a representação no diagrama de vectores mostra claramente as diferenças relativas para cada parâmetro dos tecidos, mesmo quando a variância total é de apenas  $\approx 60\%$  (relativamente aos dados iniciais para os dois primeiros factores extraídos). Nos outros estudos, pretendia-se diferenciar a acção individual de cada enzima nos dois níveis de acção mecânica. A variância total foi sempre superior a  $60\%$  para os dois primeiros factores extraídos. O facto da extensibilidade do tratamento ser dada pela perda de peso, que tem sempre uma variância associada superior a  $80\%$ , torna a análise mais fácil, desde que feita em função do vector perda de peso. A aplicação desta metodologia depende dos casos concretos e das informação que se pretendem extrair, tendo o cuidado de desprezar o mínimo de informação inicial.

O tratamento enzimático altera essencialmente as propriedades de flexão, para a flanela e popelinas estudadas. Na flanela, a espessura também é um parâmetro importante pois está ligado à remoção do pêlo (aumento do grau de "pilling") da superfície do tecido, pelo tratamento celulolítico. As variações de 2HB estão essencialmente ligadas à acção de limpeza das fibras pelas misturas celulolíticas ou à formação de microfibrilas (ver fotografias em IV.4 e IV.9) em que é alterada a fricção interfibras. A acção "endo" parece formar microfibrilas, conjuntamente com a alta fricção mecânica nos tecidos, o que vai aumentar a histerese do movimento de flexão (2HB).

Poder-se-ia esperar também, que os valores de histerese ao corte pudessem ser alterados da mesma forma significativa que os valores da histerese à flexão. Pensa-se que isto se deve ao facto dos tecidos estudados serem do tipo tafetá simples (popelina e flanela), em que as variações interfibras são reflectidas nas propriedades de flexão (93). As variações da fricção interfibras só seriam reflectidas nas propriedades de corte se os tratamentos enzimáticos tivessem sido efectuados em malhas (93).

## 5- CONCLUSÕES

Os resultados desta tese apontam para os seguintes pontos inovadores:

1- O tratamento do algodão com celulasas, para perdas de peso até  $6\%$ , altera as propriedades dos tecidos que estão ligadas à formação ou remoção de microfibrilas à superfície das fibras (IV.4, IV.7, IV.9). Nos tafetás, o parâmetro mais conveniente para medir estas alterações é a histerese do movimento de flexão (IV.3). Nas flanelas, convém também medir a espessura, devido à remoção de pelagem na superfície do tecido por acção celulolítica (IV.3).

2- A perda de resistência dos tecidos tratados com celulasas, está essencialmente ligada à actividade em endoglucanase (IV.5.5, IV.7.7, IV.9.3).

3- A fricção nas fibras do algodão obtida por acção mecânica coopera com a hidrólise celulolítica (IV.6):

- i) criando uma maior superfície onde a enzima pode actuar.
- ii) aumentando a desadsorção da enzima do substrato.

4- A fricção mecânica aumenta a actividade relativa em endoglucanase, quer num processo simultâneo quer num processo sequencial (com tratamento celulolítico e posterior lavagem com forte acção mecânica) (IV.4, IV.5.1, IV.7.1, IV.9.1).

## VI - PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

Os estudos iniciados neste trabalho evidenciam a importância da acção mecânica na actividade das celulasas sobre o algodão. O facto da fricção mecânica aumentar a actividade "endo", relativamente à actividade "exo", tem implicações importantes na obtenção de efeitos de acabamento específicos, porque o tratamento com celulasas pode ser obtido em diferentes tipos de máquinas e métodos (com diferentes níveis de acção mecânica).

O completo entendimento da cooperação entre a acção mecânica e a acção celulolítica poderá passar pela modelização matemática destas interacções, estudando a relação entre a velocidade de hidrólise com um parâmetro que possa quantificar a acção mecânica usada.

O esclarecimento do mecanismo de acção dos componentes purificados e das suas partes estruturais, CBDs e domínios catalíticos, nos diferentes níveis de acção mecânica, é essencial para se poderem obter novos tipos de acabamentos mais sofisticados. Para isso, será necessário a produção destes componentes, em escalas na ordem de gramas, o que ainda não é viável tecnicamente.

Poderão ser efectuados outros estudos, nomeadamente, sobre a influência de tingimentos prévios e da força iónica na acção das celulasas. A procura de microrganismos produtores de celulasas actuaes a baixa temperatura seria desejável para processos *pad-batch*.

Do ponto de vista do acabador, seria necessário o desenvolvimento de metodologias simples para medição da actividade das celulasas correntemente usadas na indústria têxtil. Por outro lado, as excessivas perdas de peso e de resistência também poderiam ser evitadas por controle *on-line* do tratamento enzimático, por medição dos açúcares redutores ou do material orgânico produzido.



**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**  
(segundo a norma NP-405)

- 1- TAKAI, M., HAYASHI, J., NISIZAWA, K. e KANDA, T., **J. App. Poly. Scien: App. Poly. Symp.**, 1983, 37, 345-361
- 2- HEMMPEL, W. H., **Int. Tex. Bull. D/P/F**, 1991, 3, 5-14
- 3- ASFERG, L. O. e VIDEBÆK, T., **Int. Tex. Bull. D/P/F**, 1990, 2, 5-8
- 4- KOCHOVI, D., VIDEBÆCK, T. e CEDRONI, D., **Am. Dyes. Rep.**, 1990, September, 24-28
- 5- MURATA, M., HOSHINO, E., YOKOSUKA, M. e SUZUKI, A., **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 1993, 70, 53-58
- 6- *Enzymes at work*, Novo Nordisk A/S, Dinamarca, Setembro 1992
- 7- GHOSH, B. L. e DUTTA A. K., **J. Tex. Inst.**, 1980, 108-116 & 1983, 83-91
- 8- ENARI, T. M. e NIKU-PAAVOLA, M. L., **CRC Crit. Rev. Biotechnol.**, 1987, 5, 67-87
- 9- TROTMAN, E. R., *Textile Scouring and Bleaching*, 1<sup>st</sup>ed, Textile Book Service, 1968
- 10- GUILLEN, J. G. e GARRIDO, J. M., *Algodon y Celulosa, Estructura y Propiedades*, Terrassa, Universidade Politècnica de Barcelona, 1987
- 11- NEVELL, T. P. e ZERONIAN, S. H., em *Cellulose Chemistry and Its Applications*, Ed. Nevell e Zeronian, John Wiley & Sons, 1985, 1, 15-29
- 12- HON, D., **Cellulose**, 1994, 1, 1-25
- 13- EVANS, E., WALES, D., BRATT, R. e SAGAR, B., **J. Gen. Microbiol.**, 1992, 138, 1639-1646
- 14- NEVELL, T. P., em *Cellulose Chemistry and Its Applications*, Ed. Nevell e Zeronian, John Wiley & Sons, 1985, 9, 223-242
- 15- NEVELL, T. P., em *Cellulose Chemistry and Its Applications*, Ed. Nevell e Zeronian, John Wiley & Sons, 1985, 10, 243-265
- 16- SAGAR, B., em *Cellulose and its Derivatives: Chemistry, Biochemistry and Applications*, Ed. Kennedy, Phillips, Wedlock e Williams, Ellis Horwood, 1985, 16, 199-207
- 17- ROWLAND, S. e BERTONIERE, N., em *Cellulose Chemistry and Its Applications*, Ed. Nevell e Zeronian, John Wiley & Sons, 1985, 4, 112-137
- 18- ZERONIAN, S. H., em *Cellulose Chemistry and Its Applications*, Ed. Nevell e Zeronian, John Wiley & Sons, 1985, 5, 138-158
- 19- ZERONIAN, S. H., em *Cellulose Chemistry and Its Applications*, Ed. Nevell e Zeronian, John Wiley & Sons, 1985, 6, 159-180
- 20- ALMEIDA, L., *Etude de l'Influence des Conditions de Mercerisage sur les Proprietes des Fibres Cellulosiques (Tese de Doutorado)*, Université Haute Alsace e Université Louis Pasteur de Strasbourg, 1978
- 21- FERSHT, A., *Enzyme Structure and Mechanism*, 2<sup>nd</sup>ed, New York, W. R. Freeman and Company, 1984
- 22- FINCH, P. e ROBERTS, J. C., em *Cellulose Chemistry and Its Applications*, Ed. Nevell e Zeronian, John Wiley & Sons, 1985, 12, 312-343
- 23- TROYER, K., em *Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose*, Ed. Haigler e Weimer, Marcel Dekker, Inc., 1991, 15, 311-326
- 24- DEHORITY, B., em *Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose*, Ed. Haigler e Weimer, Marcel Dekker, Inc., 1991, 16, 327-354
- 25- COUGHLAN, M. P. e LJUNGDAHL, G., em *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*, Ed. Aubert, Beguin e Millet, Academic Press Limited, 1988, 11-30
- 26- *Regulatory Aspects of Microbial Food Enzymes*, 4<sup>th</sup>ed, The Association of Microbial Food Enzyme Producers, Brussels, EC
- 27- WARD, O. P., em *Comp. Biotc.*, Ed. Moo-Yong, Pergamon Press, 1985, 3, 825-828,
- 28- *Enzyme Nomenclature*, New York, Academic Press, 1978
- 29- WOOD, T., em *Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose*, Ed. Haigler e Weimer, Marcel Dekker, Inc., 1991, 21, 491-534
- 30- GHOSE, T. K., **Pure & Applied Chem.**, 1987, 59, 257-268
- 31- GUSAKOV, A. e SINITSYN, A., **Biotec. Bioeng.**, 1992, 40, 663-671
- 32- TEERI, T., JONES, A., KRAULIS, P., ROUVINEN, J., PENTILLÄ, M., HARKKI, A., NEVALAINEN, H., VANHANEN, S., SALOHEIMO, M. e KNOWLES, J., em *Trichoderma reesei*

- Cellulases: Biochemistry, Genetics, Physiology and Applications*, Ed. Kubicek *et. al.*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1990, 10, 156-167
- 33- NEVALAINEN, H., PENTILLÄ, M., HARKKI, A., TEERI, T. e KNOWLES, J., em *Molecular Industrial Mycology-Systems and Applications for Filamentous Fungi*, Ed. Leong e Berka, Marcel Dekker, Inc., 1991, 6, 129-148
- 34- KNOWLES, J., LEHTOVAARA, P. e TEERI, T., **Trends Biotech.**, 1987, 5, 255-261
- 35- ONG, E., GILKES, N., MILLER, R., WARREN, R. e KILBURN, D., **Biotech. Bioeng.**, 1993, 42, 401-409
- 36- KILBURN, D., ASSOULINE, Z., DIN, N., GILKES, N., ONG, E., TOMME, P. e WARREN, R., em *Trichoderma reesei Cellulases and Other Hidrolases: Enzyme Scrutures, Biochemistry, Genetics and Applications*, Ed. Suominen e Reinikainen, Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, Helsinki, 1993, 8, 281-290
- 37- REINIKAINEN, T., *The Cellulose Binding Domain of Cellobiohydrolase I from Trichoderma reesei (Tese de Doutoramento)*, VTT Publications, Espoo, Finland, 1994, vol. 206
- 38- SRISODSUK, M., *Mode of Action of Trichoderma reesei Cellobiohydrolase I on Crystalline Cellulose (Tese de Doutoramento)*, VTT Publications, Espoo, Finland, 1994, vol. 188
- 39- WITHERS, S., TULL, D., GEBLER, J., BRAUN, C., AEBERSOLD, R., WANG, Q., WARREN, R., KILBURN, D. e GILKES, N., em *Trichoderma reesei Cellulases and Other Hidrolases: Enzyme Scrutures, Biochemistry, Genetics and Applications*, Ed. Suominen e Reinikainen, Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, Helsinki, 1993, 8, 117-123
- 40- LINKO, M., em *Trichoderma reesei Cellulases and Other Hidrolases: Enzyme Scrutures, Biochemistry, Genetics and Applications*, Ed. Suominen e Reinikainen, Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, Helsinki, 1993, 8, 9-11
- 41- SALOHEIMO, A., HENRISSAT; B. e PENTILLÄ, M., em *Trichoderma reesei Cellulases and Other Hidrolases: Enzyme Scrutures, Biochemistry, Genetics and Applications*, Ed. Suominen e Reinikainen, Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, Helsinki, 1993, 8, 139-146
- 42- WARD, M., WU, S., DAUBERMAN, J., WEISS, G., LARENAS, E., BOWER, B., REY, M., CLARKSON, K. e BOTT, R., em *Trichoderma reesei Cellulases and Other Hidrolases: Enzyme Scrutures, Biochemistry, Genetics and Applications*, Ed. Suominen e Reinikainen, Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, Helsinki, 1993, 8, 153-158
- 43- NIDETZKY, B. e CLAEYSSSENS, M., **Biotech. Bioeng.**, 1994, 44, 961-966
- 44- WARD, M., SHOEMAKER, S. e WEISS, G., Patent Cooperation Treaty, 1992, WO 92/06209
- 45- NIDETZKY, B., HAYN, M., MACARRON, R. e STEINER, W., **Biotech. Lett.**, 1993, 15, 71-76
- 46- NIDETZKY, B., STEINER, W., HAYN, M. e CLAEYSSSENS, M., **Biochem. J.**, 1994, 298, 705-710
- 47- WOODWARD, J., LIMA, M. e LEE, N., **Biochem. J.**, 1988, 255, 895-899
- 48- BIELY, P., VRSANSKA, M. e CLAEYSSSENS, M., em *Trichoderma reesei Cellulases and Other Hidrolases: Enzyme Scrutures, Biochemistry, Genetics and Applications*, Ed. Suominen e Reinikainen, Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, Helsinki, 1993, 8, 99-108
- 49- SCHÜLEIN, M., TIKHOMIROV, D. e SCHOU, C., em *Trichoderma reesei Cellulases and Other Hidrolases: Enzyme Scrutures, Biochemistry, Genetics and Applications*, Ed. Suominen e Reinikainen, Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, Helsinki, 1993, 8, 109-116
- 50- DAVIES, G., TOLLEY, S. e SCHÜLEIN, M., em *Trichoderma reesei Cellulases and Other Hidrolases: Enzyme Scrutures, Biochemistry, Genetics and Applications*, Ed. Suominen e Reinikainen, Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, Helsinki, 1993, 8, 81-86
- 51- FOCHER, B., MARZETTI, A., BELTRAME, P. e CARNITI, P., em *Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose*, Ed. Haigler e Weimer, Marcel Dekker, Inc., 1991, 14, 293-310
- 52- BELTRAME, P., CARNITI, P., FOCHER, B., MARZETTI, A. e CATTANEO, M., **J. App. Poly. Scien**, 1982, 27, 3493-3502
- 53- STUART, J. e RISTROPH, D., **Biotech. Bioeng.**, 1985, 27, 1056-1059
- 54- NIDETZKY, B. e STEINER, W., **Biotech. Bioeng.**, 1993, 42, 469-479
- 55- BELDMAN, G., VORAGEN, A., ROMBOUITS, F., SEARLE-VAN LEEUWEN, M. e PILNIK W., **Biotech. Bioeng.**, 1987, 30, 251-257
- 56- BAILEY, C., **Biochem. J.**, 1989, 262, 1001-1002
- 57- SATTTLER, W., ESTERBAUER, H., GLATTER, O. e STEINER, W., **Biotech. Bioeng.**, 1989, 33, 1221-1234
- 58- ANDERSEN, P., em *Palestra sobre Stone-Wash Enzimático com Produtos Denimax*, Novo Nordisk - Aquitex, Porto, 2-3 de Junho de 1992

- 59- KANDA, T., WAKABAYASHI, K. e NISIZAWA, K., **J. Biochem.**, 1976, 79, 977-988
- 60- UEDA, M., KOO, H., WAKIDA, T. e YOSHIMURA, Y., **Tex. Res. J.**, 1994, 615-618
- 61- PARK, J., TAKAHATA, Y., KAJIUCHI, T. e AKEHATA, T., **Biotec. Bioeng.**, 1992, 39, 117-120
- 62- CAVACO-PAULO, A. e ALMEIDA, L., em *FEMS Symposium: Lignin Biodegradation and Transformation*, Ed. Duarte, Ferreira e Ander, Forbitech, Lisboa, Portugal, 1993, 101-102
- 63- ALMEIDA, L. e CAVACO-PAULO, A., **Melliand Textilber.**, 1993, 74, E184-E185/404-407
- 64- BUSCHLE-DILLER, G. e ZERONIAN, S., **Tex. Chem. Color**, 1994, 26(4), 17-24
- 65- KOO, H., UEDA, M., WAKIDA, T., YOSHIMURA, Y. e IGARASHI, T., **Tex. Res. J.**, 1994, 70-74
- 66- CAVACO-PAULO, A. e ALMEIDA, L., **Biocatalysis**, 1994, 10, 353-360
- 67- LEISOLA, M., LINKO, M. e KARVONEN, E., em *Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose*, Ed. Bailey, Enari e Linko, SITRA, Aulanko, Finland, 1975, 297-313
- 68- ALMEIDA, L., em *Manual de Engenharia Têxtil*, Ed. Araujo e Castro, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1984, 695-830
- 69- SPANGLER, W., em *Detergency Theory and Test Methods-Part I*, Ed. Cutler e Davis, Marcel Dekker, Inc., 1972, 413-451
- 70- SHORT, B., em *Detergency Theory and Test Methods-Part I*, Ed. Cutler e Davis, Marcel Dekker, Inc., 1972, 237-268
- 71- HEARLE, J., LOMAS, B., COOKE, W. e DUERDEN, I., *Fibre Failure and Wear of Materials*, Ellis Horwood, Ltd., Chichester, 1989
- 72- CAVACO-PAULO, A., Amaciamento do Algodão por Hidrólise Enzimática (*Tese de Mestrado*), Universidade do Minho, 1992
- 73- RAMOS, L., NAZHAD, M. e SADDLER, J., **Enzyme Microb. Technol.**, 1993, 15, 1-11
- 74- BELTRAME, P., CARNITI, P., FOCHER, B., MARZETTI, A. e CATTANEO, M., **J. App. Poly. Scien.**, 1981, 26, 1989-1991
- 75- GAMA, F., FARO, C., TEIXEIRA, J. e MOTA, M., **Enzyme Microb. Technol.**, 1993, 15, 57-61
- 76- CHIDAMBARESWARAN, P., SREENIVASAN, S. e PATIL, N., **Tex. Res. J.**, 1987, 219-222
- 77- NELSON, M. e O'CONNOR, R., **J. App. Poly. Scien.**, 1964, 8, 1311-1341
- 78- FINK, H., HOFMAN, D. e PURZ, H., **Acta Polym.**, 1990, 41, 131-137
- 79- BUSCHLE-DILLER, G., ZERONIAN, S., PAN, N. e YOON, M., **Tex. Res. J.**, 1994, 270-279
- 80- ARAUJO, M., em *Manual de Engenharia Têxtil*, Ed. Araujo e Castro, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1984, 1269-1464
- 81- KAWABATA, S., *The Standardization and Analysis of Hand Evolution*, 2nd. Ed., The Textile Machinery Society of Japan, July 1980
- 82- HES, L., HYBIL, V. e BANDYOPADHYAY, B., **Ind. J. of Fib. & Tex. Res.**, 1991, 16, 195-199
- 83- HES, L., CAVACO-PAULO, A. e ALMEIDA, L., em "*2<sup>nd</sup> International Clothing Conference: Objective Measurement Technology in Textile and Clothing Interface*", University of Bradford, UK, 1992, 7-9 July
- 84- CAVACO-PAULO, A., **Textília**, 1993, 8, 22-27
- 85- Conjunto de comunicações do Seminário: *Practical Developments in Objective Measurements for Textiles and Clothing*, Sprint Project RA115, BTTG, Manchester, UK, 5th December, 1991
- 86- PAYOT, F., em *Practical Developments in Objective Measurements for Textiles and Clothing*, Sprint Project RA115, BTTG, Manchester, UK, 5th December, 1991
- 87- BISHOP, D. e COX, D., **J. Tex. Inst.**, 1994, 85, 78-81
- 88- BRADFORD, M., **Anal. Biochem.**, 1976, 72, 248-255
- 89- GONÇALVES, M. L. S. S., *Métodos Instrumentais Para Análise de Soluções*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1983
- 90- NORUSIS, M. J., *SPSS for Windows, Professional Statistics, Release 6.0*, SPSS Inc., Chicago, Illinois, 1993
- 91- POSTLE, R., **Int. J. Clothing Scien. Technol.**, 1989, 2, 7-17
- 92- GAMA, F., TEIXEIRA, J. e MOTA, M., **Biotec. Tec.**, 1991, 5, 377-382
- 93- POSTLE, R., **Textile Asia**, 1989, October, 59-68
- 94- MATSUO, T., HARADA, T. e SAITO, M., **Textile Horizons**, 1990, May, 45
- 95- BAILEY, M., ENARI, T. e LINKO, M., (Eds.) *Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose*, SITRA, Aulanko, Finland, 1975
- 96- SUOMINEN, P. e REINIKAINEN, T., (Eds.) *Trichoderma reesei Cellulases and Other Hidrolases: Enzyme Structures, Biochemistry, Genetics and Applications*, Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, Helsinki, 1993, vol. 8

97- PALOHEIMO, M., MIETTINEN-OINONEN, A., TORKKELI, T., NEVALAINEN, H. e SUOMINEN, P., em *Trichoderma reesei Cellulases and Other Hidrolases: Enzyme Scrutures, Biochemistry, Genetics and Aplications*, Ed. Suominen e Reinikainen, Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, Helsinki, 1993, 8, 229-238

98- REINIKAINEN, T., HENRIKSSON, K., SIIKA-AHO, M., TELEMAN, O. e POUTANEN, K., **Enzyme Microb. Technol.**, 1995, em impressão

99- CAMINAL, G., LÓPES-SATIN, J. e SOLÀ, C., **Biotec. Bioeng.**, 1985, 27, 1282-1290

100- GAMA, F., TEIXEIRA, J. e MOTA, M., **Biotec. Bioeng.**, 1994, 43, 381-387

101- ZEYER, C., RUCKER, J., JOYCE, T., HEITMANN, J., **Tex. Chem. Color**, 1994, 26(3), 26-

31

102- FINK, H. e PHILIPP, B., **J. App. Poly. Scien**, 1985, 30, 3779-3790

103- ROWLAND, S. e HOWLEY, P., **Tex. Res. J.**, 1988, 96-101