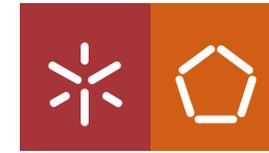




Otimização dos processos de tratamento enzimático
de materiais celulósicos com amilases e celulasas

Isabel Maria Maia Alaminos

UMinho | 2021

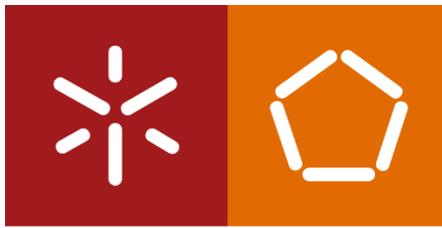


Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Isabel Maria Maia Alaminos

**Otimização dos processos de tratamento
enzimático de materiais celulósicos com
amilases e celulasas**

dezembro de 2021



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Isabel Maria Maia Alaminos

**Otimização dos processos de
tratamento enzimático de materiais
celulósicos com amílases e celulasas.**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Química Têxtil

Trabalho efetuado sob a orientação do

Professor Doutor Jorge Gomes Santos

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição

CC BY

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao meu orientador, Professor Doutor Jorge Gomes Santos pelo apoio, esclarecimento, disponibilidade e paciência demonstrados durante todo o desenvolvimento da presente dissertação.

Agradeço à minha família, em especial ao meu namorado e aos meus pais por todo o apoio, amor e ajuda demonstrados ao longo destes anos incertos que a pandemia nos proporcionou.

Agradeço ao Eng.º Jorge Faria da empresa AQUITEX por me ter aberto as portas à família AQUITEX, disponibilizando a sua empresa, laboratório e trabalhadores para que me ajudassem na conclusão de mais uma etapa da minha vida profissional e académica. Agradeço à Eng.ª Matilde Faria pelo acompanhamento, apoio e por ter exposto o que queria melhorar na empresa, de forma que o tema escolhido para esta dissertação pudesse ajudar a AQUITEX. Agradeço a todas as técnicas do laboratório têxtil, em especial à Eng.ª Soraia Alves e Andreia Marques que estiveram sempre disponíveis para me ajudar em tudo o que eu precisei e que foram sem dúvida um grande apoio em todo este processo.

Por fim, agradeço a todos os professores e técnicos que se cruzaram no meu percurso académico.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

OTIMIZAÇÃO DOS PROCESSOS DE TRATAMENTO ENZIMÁTICO DE MATERIAIS CELULÓSICOS COM AMÍLASES E CELULASES

RESUMO

A otimização dos processos de tratamento têxtil é fundamental, tendo em vista a redução dos tempos de processamento, consumo de reagentes, energia e água, melhorando dessa forma a sua sustentabilidade económica e ambiental.

Para se proceder à otimização dos processos de tratamento enzimático torna-se imprescindível o desenvolvimento de métodos precisos, rápidos e de fácil implementação que permitam determinar a atividade enzimática nas mais variadas condições de processamento, situação que não se verifica na atualidade. Neste contexto, procedeu-se no âmbito do presente trabalho ao desenvolvimento de um método para a determinação da atividade enzimática das celulases e de outro para a determinação da atividade enzimática das amilases que cumprem os requisitos inicialmente definidos, criando dessa forma as condições necessárias para que se possa proceder à otimização dos processos de tratamento com estas duas enzimas.

Palavras-Chave: Amilases; Atividade Enzimática; Celulases; Métodos;

OPTIMIZATION OF ENZYMATIC TREATMENT PROCESSES OF CELLULOSIC MATERIALS WITH AMYLASES AND CELLULASES

ABSTRACT

The optimisation of textile treatment processes is fundamental in order to reduce processing times, reagent, energy and water consumption, thus improving their economic and environmental sustainability.

To optimise enzymatic treatment processes, it is essential to develop precise, fast, and easy-to-implement methods for determining enzyme activity in a wide range of processing conditions, which is currently not the case. In this context, this work aimed at developing a method for determining the enzymatic activity of cellulases and another for determining the enzymatic activity of amylases which meet the requirements initially defined, thereby creating the necessary conditions for the optimisation of treatment processes with these two enzymes.

Keywords: Amylases; Cellulases; Enzymatic Activity; Methods; Textile Industry.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xi
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVO	1
1.2. ENQUADRAMENTO E MOTIVAÇÃO DO TRABALHO	1
1.3. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	2
CAPÍTULO 2: ESTADO DA ARTE	3
2.1. UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS NO PROCESSAMENTO TÊXTIL	3
2.2. CELULASES	4
2.3. AMILASES	5
2.4. MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA AMILASE	6
2.5. MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CELULASE	7
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1. MATERIAIS	11
3.2. MÉTODOS	12
3.2.1. TINGIMENTO DE TECIDO 100% ALGODÃO E 100% VISCOSE COM CORANTES REATIVOS	12
3.2.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CORANTE NOS TECIDOS DE ALGODÃO E VISCOSE TINGIDOS	12
3.2.3. TRATAMENTO DOS TECIDOS DE ALGODÃO E VISCOSE COM CELULASES	13
3.2.4. ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS CELULASES	15
3.2.4.1. ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS CELULASES POR AVALIAÇÃO DA DIFERENÇA DE PESO	15

3.2.4.2. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA CELULASE ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DA PERCENTAGEM DE CORANTE REMOVIDA NO DECORRER DO TRATAMENTO	15
3.2.4.3. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CELULASE ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DO KIT DA MEGAZYME	16
3.2.5. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA AMILASE	17
CAPÍTULO 4: APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	18
4.1.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CORANTE NOS TECIDOS DE ALGODÃO E VISCOSE	18
4.1.2. ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS CELULASES POR AVALIAÇÃO DA PERCENTAGEM DE PESO PERDIDO NO TRATAMENTO	19
4.1.3. ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS CELULASES ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DA PERCENTAGEM DE CORANTE REMOVIDO DURANTE O TRATAMENTO	24
4.1.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS CELULASES ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DO KIT DA MEGAZYME – “CELLULASE ASSAY KIT (CELLG5 METHOD)”	27
4.2. RESULTADOS OBTIDOS NO TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM A AMILASE	29
4.2.1. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA COR DO COMPLEXO AMIDO-iodo	29
4.2.2. MODELO MATEMÁTICO QUE ESTABELECE A RELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE AMIDO NO MATERIAL E O VALOR DE K/S DA AMOSTRA TESTADA	31
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	34
5.1. CONCLUSÕES	34
5.2. PERSPETIVAS FUTURAS	35
BIBLIOGRAFIA	36
ANEXOS	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPNPG5: *4,6-O-(3-Ketobutylidene)-4-nitrophenyl-β-D-cellopentaoside*

CMC: Carboximetilcelulose

DNS: Ácido 3,5 dinitro-salicílico

PNP: *4-nitrophenol*

PNPC: *p-Nitrophenol-D-cellobioside*

Res-CB: *resorufin-b-D-cellobioside*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-Escala TEGEWA (TAVARES, 2017)	6
Figura 2-Reação química desenvolvida no decorrer do processo de análise com o KIT da megazyme	10
Figura 3-Processo de tingimento com corantes reativos.....	12
Figura 4-Processo de tratamento dos substratos de algodão e viscose com celulases	14
Figura 5-Curva de Calibração do corante Azul Brilhante Sumifix R Especial em H_2SO_4 a 75%	18
Figura 6-Espectros K/S da amostra testada com a solução de iodo/iodeto de potássio em função do tempo.....	30
Figura 7-Espectro k/s da amostra testada com a solução de iodo/iodeto de potássio em função do tempo a 580nm.....	30
Figura 8-Percentagem de redução do K/S da amostra testada com a solução de iodo/iodeto de potássio em função do tempo a 580nm	31
Figura 9-Espectros K/S em função da concentração de amido no material	32
Figura 10-Relação entre os valores de K/S ao comprimento de onda de 580nm e a respectiva concentração de amido na amostra	32

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1-Composição das soluções de tingimento com corantes reativos.....	12
Tabela 2-Composição das soluções de tratamento dos tecidos de algodão e viscose.....	14
Tabela 3-Resultados obtidos na dissolução dos materiais tingidos em H ₂ SO ₄	18
Tabela 4-Avaliação da atividade enzimática das celulases no tratamento do algodão na ausência de molhantes e agentes sequestrantes.....	19
Tabela 5-Avaliação da atividade enzimática das celulases no tratamento da viscoses na ausência de molhantes e agentes sequestrantes.....	19
Tabela 6-Avaliação da atividade enzimática das celulases no tratamento do algodão na presença de molhantes e agentes sequestrantes.....	20
Tabela 7-Avaliação da atividade enzimática das celulases no tratamento da viscose na presença de molhantes e agentes sequestrantes.....	23
Tabela 8-Avaliação da atividade enzimática das celulases no tratamento do algodão, através da avaliação da percentagem de corante removido no tratamento.....	24
Tabela 9-Avaliação da atividade enzimática das celulases no tratamento da viscose, através da avaliação da percentagem de corante removido no tratamento.....	24
Tabela 10-Avaliação da atividade enzimática das celulases no tratamento do algodão, na presença de molhantes e sequestrantes, através da avaliação da percentagem de corante removido no tratamento.	25
Tabela 11-Avaliação da atividade enzimática das celulases no tratamento da viscose, na presença de molhantes e sequestrantes, através da avaliação da percentagem de corante removido no tratamento.	26
Tabela 12-Resultados obtidos na aplicação do kit da megazyme.....	27

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1. OBJETIVO

O principal objetivo do presente projeto de investigação prende-se com a otimização dos processos de aplicação das amilases e celulasas nos tratamentos de descolagem, *biopolishinge anti-pilling* de materiais celulósicos. Pretende-se de igual forma criar as condições necessárias para que se possa avaliar a possibilidade de combinar estas enzimas com outros reagentes, situação que poderia permitir reduzir o número de etapas envolvidas no processamento dos materiais têxteis, com todas as vantagens económicas e ambientais inerentes a essa situação. Para alcançar esses objetivos será necessário avaliar a atividade enzimática nas mais diversas condições de aplicação, pelo que será também necessário identificar e/ou desenvolver métodos analíticos simples e precisos, cuja realização em âmbito industrial seja exequível.

Com a realização deste projeto espera-se criar as condições necessárias para avaliar e otimizar o tratamento enzimático deste tipo de materiais, bem como identificar e/ou desenvolver métodos analíticos precisos e simples que permitam determinar a atividade enzimática das amilases e celulasas nas mais diversas condições de aplicação.

1.2. ENQUADRAMENTO E MOTIVAÇÃO DO TRABALHO

A indústria têxtil é considerada uma das mais poluentes, existindo estudos que demonstram que consome entre 1- 5 kg de produtos químicos por cada kg de materiais têxteis que produz, sendo boa parte dos reagentes utilizados considerados como prejudiciais para a saúde e/ou para o meio ambiente (Muthu, 2018). Urge, pois, encontrar soluções para alterar esta situação. Nesse sentido tem-se verificado um crescente interesse pela utilização de enzimas no processamento têxtil, nomeadamente na descolagem, branqueamento e tratamento *biopolishing* do algodão, na descolagem da seda, no branqueamento e tratamento antifeltragem da lã e ainda no tratamento de efluentes têxteis (Nierstrasz, 2010) (Vigneswaran, 2014). Como são aplicadas em condições moderadas de temperatura e pH, o consumo de energia e a carga poluente dos efluentes são reduzidos quando comparados com os processos tradicionais. Verifica-se também com a utilização de enzimas uma menor emissão de gases com efeito estufa, menor consumo de água e menor volume de efluentes gerados no processamento têxtil (Bhatia, 2017). Acresce ainda o facto de,

por serem muito específicas na sua ação, gerarem quantidades mínimas de subprodutos das reações em que estão envolvidas, o que faz com que os riscos para os seres humanos e o meio ambiente sejam minimizados (Muthu, 2014).

1.3. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

No Capítulo 1 apresenta-se a introdução, que tem como subtópicos o objetivo, o enquadramento e motivação e a descrição da estrutura da dissertação.

No Capítulo 2 apresenta-se o estado da arte, no qual se insere o enquadramento teórico, onde se aborda a origem das celulasas e amílases, a sua aplicação na indústria têxtil e os processos existentes para quantificação da atividade enzimática.

No Capítulo 3 descrevem-se os materiais e métodos utilizados na quantificação da atividade enzimática das celulasas e amílases selecionadas.

No Capítulo 4 apresentam-se e descrevem-se os resultados obtidos nos ensaios experimentais realizados.

No Capítulo 5 apresentam-se as conclusões e perspectivas futuras.

No Capítulo 6 apresentam-se as referências bibliográficas.

CAPÍTULO 2: ESTADO DA ARTE

2.1. UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS NO PROCESSAMENTO TÊXTIL

A utilização de enzimas nos mais variados processos têxteis tem-se tornado muito popular devido à sua grande aptidão para substituir agentes químicos orgânicos e inorgânicos que são normalmente utilizados na indústria têxtil, no âmbito dos processos de descolagem, branqueamentos, acabamentos, entre outros. As amilases são utilizadas em processos de descolagem e as celulases são utilizadas em processos de *biostoning* e desgaste de materiais de ganga, tal como também no tratamento *anti-pilling* de materiais de algodão. Bahtiyari, et al., (2008) afirma que a atividade destas enzimas não é controlada de forma adequada, pois mesmo havendo muitos procedimentos disponíveis para a determinação da atividade enzimática, nem todos têm a mesma sensibilidade, são de difícil implementação e não são adaptados à indústria têxtil, mas sim indicados para outras áreas, tais como a ciência médica, bioquímica e indústria alimentar.

A utilização de enzimas na indústria têxtil tem inúmeras vantagens, sendo algumas delas as seguintes: são fáceis de usar, adaptam-se facilmente aos diversos processos produtivos têxteis, não necessitam de condições de temperatura e pH extremas, são completamente biodegradáveis, constituem uma opção economicamente viável pois permitem reduzir a utilização de químicos e o consumo de energia e, por fim, podem reduzir tempos de processamento e preservar as propriedades mecânicas dos materiais, dado o facto de serem muito seletivas nos processos que catalisam, permitindo manter quase inalterado o grau de polimerização das fibras. (Polaina J., 2007).

2.2. CELULASES

A celulose é o componente mais abundante da parede celular das plantas tratando-se também do hidrato de carbono mais comum e uma das mais importantes fontes de carbono presentes na biosfera (Zhang YH, 2006).

As celulases pertencem a um grupo de enzimas que degradam a celulose em oligossacarídeos menores e por fim em glicose. A atividade enzimática das celulases tem por base um sistema multi-componente consistindo em três tipos de celulases, entre elas as Exoglucanases/Cellobiohidrolases, Endo- β -1,4-glucanases, e β -Glucosidases/Celobiasas. (Tian Shuangqi, 2011).

As celulases são muito usadas na indústria têxtil no tratamento de materiais celulósicos. A sua aplicação no processamento têxtil começou na década de 1980 no acabamento de materiais *Denim*, de forma a obter o aspeto "*fashionable stonewash*" dando origem ao processo de *Biostoning*. Para além do processo *Biostoning*, são também utilizadas no tratamento *anti-pilling*, ou seja, na eliminação das fibras soltas existentes na superfície dos materiais que estão na origem da formação do pilling. As celulases são habitualmente aplicadas em máquinas que promovem uma elevada agitação mecânica, tais como jets, permitindo que a ação de hidrólise promovida pelas celulases, juntamente com a elevada ação mecânica exercida pelas máquinas contribuam para melhorar o tratamento *anti-pilling* (A. Cavaco-Paulo, 2003). Na indústria dos detergentes as celulases são também utilizadas na sua formulação com o objetivo de conferir maior brilho aos materiais tratados. (Polaina J., 2007).

Para além da utilização nos setores têxteis e de detergentes, as celulases são também aplicadas nas indústrias alimentares (incluindo também a de alimentos para animais), e de papel. Uma elevada variedade de bactérias e fungos produzem diversos tipos de celulases das mais variadas características, tais como os fungos *Trichoderma reesei* que produz uma celulase que se caracteriza por proporcionar uma baixa perda de resistência das fibras e reduzido *backstaining*; *Thielavia terrestris*, cuja celulase proporciona uma aparência extremamente polida às fibras (*biopolishing*) e permite obter um tratamento *anti-pilling* de média intensidade e o *Chrysosporium lucknowense*, que se caracteriza por permitir um tratamento *anti-pilling* de alta intensidade e por prevenir a redeposição de corante removido (*backstaining*), entre outras (Polaina J., 2007).

2.3. AMÍLASES

O amido é aplicado sobre os fios da teia antes do processo de tecelagem para proteger a integridade dos fios, atuando também como lubrificante. A utilização de encolantes naturais, tais como o amido e seus derivados permite que estes possam ser degradados posteriormente por enzimas. O processo de descolagem enzimática, que consiste na remoção do amido após a tecelagem, recorre à utilização de amilases, sendo o processo enzimático mais antigo utilizado na indústria têxtil. O amido é também muito utilizado como espessante em pastas de estamperia e na produção de colas (A. Cavaco-Paulo, 2003).

O amido é composto por 2 tipos de polissacarídeos, a amilose e a amilopectina. A amilose é composta por uma cadeia linear composta por moléculas de glucose ligadas entre si através de ligações α -1,4 glicosídicas, tal como acontece no dissacarídeo maltose. A maltose é um dímero, normalmente derivado da amilose através de hidrólise. A amilose é solúvel em água e constitui cerca de 20% do amido total. A amilopectina é constituída por uma cadeia ramificada de moléculas de α -D-glucose. A ramificação ocorre entre o radical glicosídico -OH de uma cadeia e o sexto carbono de outra molécula de glucose, formando uma ligação α -1,6 glicosídica. A amilopectina é insolúvel em água. A hidrólise parcial do amido origina a formação de moléculas de glucose, maltose e dextrinas, que são secções ramificadas da amilopectina, que corresponde a 70-80% do amido total (Liu, 2017).

As enzimas envolvidas na degradação do amido são as α -Amilases, β -Amilases e Glucoamilases. As α -Amilases e Glucoamilases são as mais utilizadas na indústria têxtil já que degradam aleatoriamente as ligações de glucose tornando a sua ação muito mais eficaz quando comparadas às β -Amilases que apenas conseguem degradar o amido em unidades de maltose, perdendo assim o seu interesse para uso industrial (A. Cavaco-Paulo, 2003). As α -amilases são usadas no processo de descolagem há quase 100 anos. As amilases mais utilizadas são de origem maioritariamente bacteriana, obtidas por exemplo através da bactéria *Bacillus subtilis*.

2.4. MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA AMILASE

A atividade enzimática da β -amilase pode ser medida através do método de *p-nitrophenyl- α -D-maltopentaoside*, monitorizando a libertação de p-nitrofenil. Tal como é referido por Erkkilä (1998) a atividade da β -amilase pode também ser medida através do Kit β -amilase da Megazyme que muito se assemelha ao Kit cuja utilização será avaliada nesta dissertação. Relativamente à atividade da Glucoamilase, esta pode também ser determinada pela libertação de p-nitrofenol da p-nitrofenil- α -D-glucose. No entanto, ambos os métodos citados para quantificação da atividade enzimática da amilase são de difícil aplicação na indústria têxtil, uma vez que são morosos e desenvolvidos para outras indústrias, tais como a indústria alimentar. Acresce o facto de não ser possível utilizar materiais têxteis com amido no decorrer da análise, nem tão pouco simular as condições reais em que as mesmas são aplicadas.

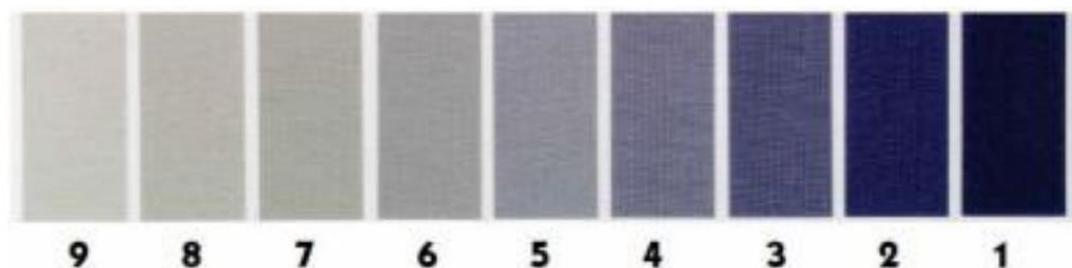


FIGURA 1-ESCALA TEGEWA (TAVARES, 2017)

Quanto à atividade enzimática da α – amilase, esta pode ser medida utilizando amido como substrato e monitorizando a formação de açúcares reduzidos, utilizando a maltose como padrão. Técnicas mais avançadas de medição da atividade da alfa e beta amilases utilizam oligossacarídeos e monitorizam a produção de cadeias mais curtas de açúcares através de métodos cromatográficos (A. Cavaco-Paulo, 2003). O método mais comum para a quantificação da atividade enzimática da α –amilase, com aplicação têxtil nos processos de desengolagem enzimática, consiste em utilizar a escala TEGEWA e uma solução de iodo/iodeto de potássio. A escala TEGEWA (Figura 1) é composta por uma gama de cores que vão desde o azul-violeta ao branco, correspondendo a cada uma delas uma determinada percentagem residual de amido no substrato testado.

Quando um tecido de algodão com amido entra em contacto com a solução de iodo/iodeto de potássio forma-se um complexo de cor azul-violeta, sendo a cor tão mais intensa quanto maior for a concentração de amido no substrato. A comparação posterior da cor obtida com as cores representadas na escala TEGEWA permite classificar o material quanto ao teor de amido residual nele presente. Este método permite detetar e quantificar a presença de amido residual no material, sendo, no entanto, essa avaliação feita de forma subjetiva, através da comparação visual entre a cor obtida e as cores representadas na escala TEGEWA. A reduzida precisão e a elevada subjetividade da análise efetuada impossibilitam a obtenção de dados fiáveis que permitam avaliar de forma precisa a atividade enzimática em diferentes condições de processamento e dessa forma contribuir com informação essencial para a otimização dos processos de descolagem e para a avaliação do impacto dos auxiliares utilizados no rendimento do processo. Torna-se também difícil comparar o desempenho entre diversas soluções comerciais de α -amilase existentes no mercado. Este é atualmente o método mais utilizado, pretendendo-se com esta dissertação torná-lo mais objetivo e preciso, fazendo com que não dependa somente da avaliação sensitiva do “olho humano”.

2.5. MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CELULASE

Existem muitos métodos descritos na literatura para determinar a atividade enzimática da celulase ainda por consolidar, devido às diversas dificuldades associadas ao processo, tais como: dificuldade em padronizar os processos de determinação da atividade enzimática, dificuldade em analisar as características finais do substrato, dificuldade em comparar os resultados no caso de diferentes origens das celulasas e da celulose (T. Shuangqi, 2011), elevado tempo de realização dos ensaios e os custos inerentes.

A atividade da celulase pode ser medida utilizando como substrato a celulose insolúvel na forma de filtro de papel, ou celulose microcristalina embebida em ácido fosfórico. A libertação de açúcares reduzidos que se formam devido à ação exercida pelas celulasas pode ser monitorizada através do Método Ácido 3,5 dinitro-salicílico (DNS) (Ghose, 1987). Este método baseia-se no facto de após a hidrólise enzimática da celulose, os açúcares reduzidos resultantes, tais como a glucose, terem a capacidade de reduzir o grupo nitro do composto DNS. Isto acontece porque o DNS reage

apenas com açúcares redutores, que por consequência vão gerar compostos, de cor avermelhada e acastanhada (T. Shuangqi, 2011). Através deste método poderemos obter uma correlação entre a quantidade de açúcar reduzido e a cor do produto obtido, podendo a análise ser realizada através de métodos espectrofotométricos (T. Shuangqi, 2011). Caso pretendamos analisar uma mistura comercial de celulases através deste método, obtém-se uma taxa de hidrólise final resultante das atividades sinérgicas das endoglucanases e das celobiohidrolases (A. Cavaco-Paulo, 2003). A atividade das endoglucanases pode ser quantificada utilizando a carboximetilcelulose (CMC) como substrato, monitorizando ou a libertação de açúcares reduzidos ou a diminuição da viscosidade das soluções de CMC. Caso essas preparações comerciais não contenham endoglucanases, as soluções de CMC não mostrarão qualquer tipo de alteração (A. Cavaco-Paulo, 2003).

De acordo com Zhou, et al. (2004) toda a atividade enzimática das celulases é usualmente quantificada pelo método do filtro de papel, atividade essa que inclui ações sinérgicas das endoglucanases, celobiohidrolases e B-glucosidases. A atividade das endoglucanases é normalmente quantificada juntamente com a atividade das carboximetilcelulases, sendo que tal se deve ao facto das endoglucanases serem as únicas celulases capazes de atuar dentro das cadeias de CMC, resultando numa maior atividade.

T. Shuangqi (2011) propõe uma alteração ao método do filtro de papel, centrando no seu colapso o foco do estudo. Assim, o método consiste em utilizar um filtro de papel como substrato e adicionar-lhe uma solução de celulases pré-incubada a 50°C, durante 30 min, a pH 5, medindo de seguida o tempo de colapso do filtro de papel. O colapso do filtro de papel ocorre quando já não há quaisquer fragmentos do mesmo presentes no meio reacional, sendo que após o “colapso” a mistura da reação é filtrada novamente com um filtro de papel e os açúcares reduzidos são medidos através do método DNS anteriormente descrito. Assim, são avaliados o tempo de atuação das enzimas (o tempo que demora a “colapsar” o filtro de papel) e a quantidade de açúcares reduzidos formados no final da reação, conseguindo-se assim comparar a sua eficácia e a respetiva atividade enzimática.

Um outro método utilizado na determinação da atividade enzimática das celulases é o método espectrofotométrico proposto por T. Shuangqi (2011), segundo o qual, no seguimento de uma reação entre produtos de uma reação enzimática e agentes cromogénicos, é possível a partir da medição da absorvância da solução determinar a atividade enzimática. Este método permite

reduzir significativamente o tempo consumido na determinação da atividade enzimática das celulasas e tem uma elevada exatidão, sendo por isso um dos métodos mais utilizados neste contexto.

Relativamente ainda ao método espectrofotométrico referido no parágrafo anterior, Coleman (2007) demonstrou que utilizando o substrato *resorufin-b-D-cellobioside* (Res-CB), quando este é hidrolisado pelas celulasas é formado o composto *Resorufin* (fluoróforo vermelho fluorescente), como produto da reação que emite radiação ao comprimento de onda de 585nm, que pode ser quantificada espectrofotometricamente. O autor comparou este método com diversos outros métodos que utilizam substratos cromogénicos e concluiu que, ao contrário deste, os mesmos não permitiam a contínua quantificação da atividade enzimática, tornando por isso este método mais vantajoso, mas algo complexo de implementar à escala industrial.

Como último exemplo de um método a ter em consideração para a determinação da atividade enzimática da celulase, T. Shuangqi (2011), refere que se usarmos *p-Nitrophenol-D-cellobioside* (PNPC) como substrato, e a formação de nitrobenzeno como escala, conseguir-se-á avaliar a atividade enzimática das celulasas. Este método reflete maioritariamente a atividade da exoglucanase. Quando o substrato é o Avicel® (Celulose Microcristalina - MCC), sabemos que a endoglucanase tem elevada capacidade de o hidrolisar, sendo por essa razão o substrato mais indicado para a quantificação da atividade enzimática nesse contexto.

Após uma análise dos diversos métodos de quantificação enzimática descritos na literatura, pretende-se ainda abordar os kits existentes no mercado que permitem a quantificação “rápida” da atividade enzimática. São de facto métodos que permitem uma obtenção de resultados mais rápida, mais precisos e com uma relação custo vs tempo bastante apelativa. No entanto, são também pouco versáteis, ou seja, apenas funcionam para um determinado substrato e não se podem misturar enzimas com outros reagentes que não os presentes no kit, pelo que não permitem avaliar por exemplo a influência de outros auxiliares utilizados no processamento enzimático. No âmbito do trabalho realizado para esta dissertação foi selecionado um kit da empresa Megazyme, denominado de *Cellulase Assay Kit (CellG5 Method)*. Este kit permite comparar várias soluções comerciais de celulasas e determinar a sua eficácia com base na quantificação da sua atividade enzimática. Para isso, o kit vem equipado com uma solução “pura” de endocelulase que servirá de padrão na comparação com as restantes amostras de celulasas.

Os reagentes integrados no *KIT CellG5* que permitirá a medição da atividade da endocelulase (*endo-1,4-β-glucanase*) são o *4,6-O-(3-Ketobutylidene)-4-nitrophenyl-β-D-cellopentaoside* (BPNPG5) bloqueado e a β -glucosidase termoestável. O grupo cetona bloqueado do BPNPG5 (*3-ketobutylidene-G_x*) impede qualquer ação hidrolítica pela β -glucosidase sobre o composto BPNPG5. A incubação com a endocelulase gera um composto oligossacarídico (*4-nitrophenyl-β-D-cellooligosaccharide*) corado não bloqueado que é rapidamente hidrolisado pela β -glucosidase em 4-nitrofenol e D-Glucose. A taxa de formação do composto 4-nitrofenol é diretamente proporcional à hidrólise do composto BPNPG5 pela endocelulase. Quando a reação termina, a cor amarela do íon fenolato aparece aquando da adição da solução tampão Tris (pH 9) (Figura 2).

A posterior medição da absorvância das soluções permite quantificar a atividade enzimática. Este kit representa um grande avanço quando comparado com a metodologia existente que, tradicionalmente, recorre à utilização de substratos como o CMC, Avicel, Filtro de Papel, entre outros. No entanto, o facto de apenas se poder utilizar um único tipo de substrato pode tornar-se uma desvantagem uma vez que não é o substrato comumente utilizado na indústria têxtil. Acresce ainda o facto de não se poder tirar conclusões sobre a influência dos auxiliares (agentes sequestrantes, molhantes, etc.) na atividade enzimática, uma vez que este kit não permite a inclusão desses reagentes no processo de análise (Anon., s.d.).

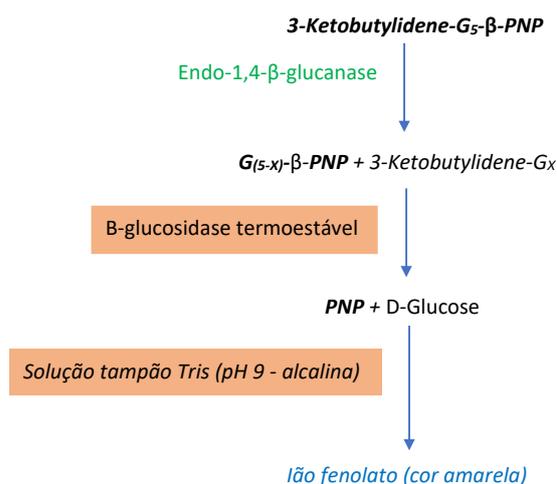


FIGURA 2-REAÇÃO QUÍMICA DESENVOLVIDA NO DECORRER DO PROCESSO DE ANÁLISE COM O KIT DA MEGAZYME

CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

Acetato de sódio, cloreto de cálcio, iodeto de potássio, etanol, amido, ácido acético glacial, acetato de sódio, carbonato de sódio e ácido clorídrico foram fornecidos por *RNM - Produtos Químicos*;

Ácido acético e hidróxido de sódio foram fornecidos por *Sameca Produtos Químicos, S.A.*;

Newcell CR, Newcell Sp. Conc. CR, Base Newcell foram fornecidas por *New Enzymes, Lda.*

Malha Jersey 100 % CO Branqueado com 170,7 g/m², tecido 100% Viscose pronto a tingir com 386,7 g/m², Toxal JET/SO (Detergente), Toxome WET (Molhante), Toxal 17N (Sequestrante), Toxome WET (formulação de molhante, sequestrante e detergente), Toxal TAC (regulador de pH) e Tecido padrão 100% CO crú com 82,6 g/m² foram fornecidos por *AQUITEX*;

Corante reativo Azul Brilhante Sumifix R Especial foi fornecido por *DyStar Anilinas Texteis, Lda.*;

Ácido sulfúrico a 75% foi fornecido por *Universidade do Minho*;

Ortofosfato di-hidrogénio sódico, *Sodium Azide* e B-TRI5500 foram fornecidos por *FEUP*;

Kit para análise da atividade enzimática da celulase fornecido por *MEGAZYME*

3.2. MÉTODOS

3.2.1. TINGIMENTO DE TECIDO 100% ALGODÃO E 100% VISCOSE COM CORANTES REATIVOS

O tingimento dos materiais utilizados na determinação da atividade enzimática das celulasas foi efetuado nas condições indicadas na tabela 1. O processo de tingimento conduzido numa máquina de tingir AHIBA IR, seguiu as indicações fornecidas na figura 3. Após o processo de tingimento, os materiais foram lavados a 40 °C durante 10 min, neutralizados a 50 °C com Toxal TAC durante 10 min, ensaboados a 100 °C com 1g/L de Toxal TEX durante 15 min e posteriormente lavados com água corrente à temperatura ambiente.

TABELA 1-COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES DE TINGIMENTO COM CORANTES REATIVOS

Substrato	Algodão	Viscose
Corante (%)	1	1
Cloreto de sódio (g/L)	40	30
Carbonato de Sódio (g/L)	10	10
Hidróxido de sódio (g/L)	10	10
Toxal TAC (g/L)	1	1
TOXAL TEX (g/L)	1	1
TOXOME WET (g/L)	1	1
Razão de banho	1:20	1:20

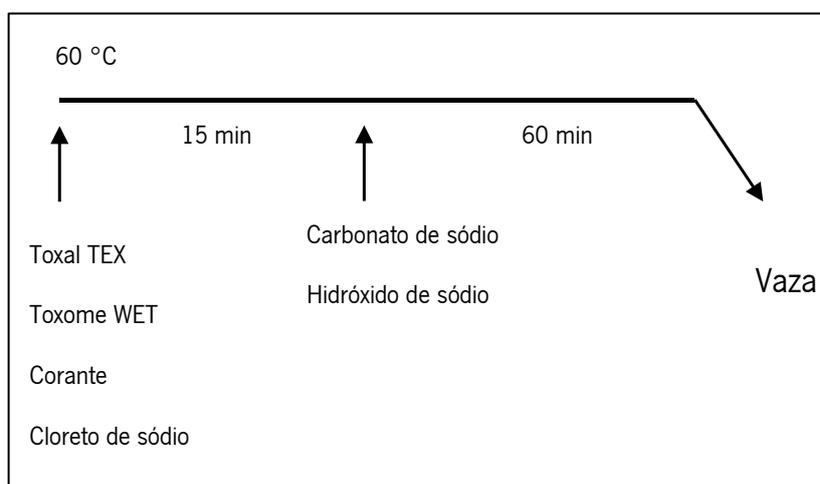


FIGURA 3-PROCESSO DE TINGIMENTO COM CORANTES REATIVOS

3.2.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CORANTE NOS TECIDOS DE ALGODÃO E VISCOSE TINGIDOS

Para determinação da concentração de corante nos dois substratos tingidos, determinou-se a curva de calibração do corante Azul Brillhante Sumifix R Especial em Ácido Sulfúrico a 75%.

Para tal prepararam-se soluções padrão com a concentração de 0,005 g/L, 0,01 g/L, 0,02 g/L, 0,03 g/L, 0,04 g/L, 0,05 g/L de corante dissolvido em ácido sulfúrico a 75%.

As soluções foram posteriormente analisadas num espectrofotômetro Shimadzu UV-2101PC, medindo as respectivas absorvâncias ao comprimento de onda de 509 nm. Por fim, com base nos dados obtidos foi determinado o modelo de regressão linear que melhor descreve a relação existente entre a concentração de corante dissolvido nas soluções de ácido sulfúrico a 75% e os respectivos valores de absorvância.

Para determinar a concentração de corante no material tingido, cortaram-se amostras de cada um dos substratos com a massa de 1g, procedendo-se de seguida à sua dissolução em ácido sulfúrico a 75%, ajustando por fim o volume da solução para os 100mL. As soluções assim obtidas foram por fim analisadas no mesmo espectrofotômetro, medindo a respetiva absorvância ao comprimento de onda de 509nm. Com base nos valores obtidos e na curva de calibração do corante em H₂SO₄ a 75% determinou-se a concentração de corante em solução e a partir deste valor a concentração de corante no material tingido.

3.2.3. TRATAMENTO DOS TECIDOS DE ALGODÃO E VISCOSE COM CELULASES

O tratamento dos tecidos de algodão e viscose com as diferentes celulases testadas no âmbito do estudo foi efetuado nas condições indicadas na tabela 2. O processo de tratamento conduzido numa máquina de tingir AHIBA IR, seguiu as indicações fornecidas na figura 4. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

TABELA 2-COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES DE TRATAMENTO DOS TECIDOS DE ALGODÃO E VISCOSE

Amostras	1+2	3+4	5+6	7+8	9+10	11+12	13+14	15+16	17+18	19+20	21+22	23+24
Newcell SP. CR Conc. (g/L)	1					1	1					
Newcell CR (g/L)		1		1	1							
Base Newcell (g/L)			1					1	1			
Toxome WET (g/L)				1		1		1			1	
Toxal 17N (g/L)					1		1		1			1
Branco (H₂O) (g/L)										1		
Acetato de sódio (pH 6) (g/L)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Esferas	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25

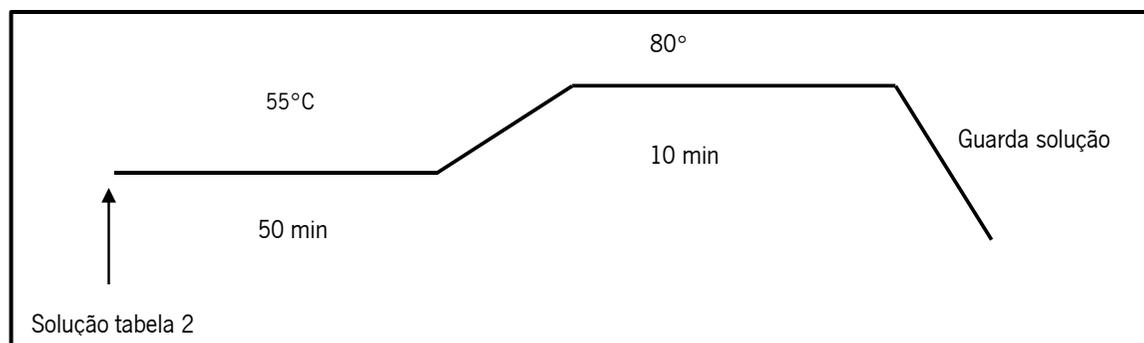


FIGURA 4-PROCESSO DE TRATAMENTO DOS SUBSTRATOS DE ALGODÃO E VISCOSE COM CELULASES

3.2.4. ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS CELULASES

3.2.4.1. ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS CELULASES POR AVALIAÇÃO DA DIFERENÇA DE PESO

Antes de executar o tratamento referido em 3.2.3. todas as amostras de substrato foram pesadas à temperatura ambiente. Após o tratamento com as celulases procedeu-se à lavagem das amostras em água corrente e secagem na estufa, deixando-as de seguida repousar durante 30min a 2h à temperatura ambiente. Decorrido este tempo as amostras foram novamente pesadas. A percentagem de perda de peso resultante do tratamento foi calculada de acordo com a equação 1.

$$\% \textit{ perda de peso} = \frac{(\textit{massa inicial} - \textit{massa final})}{(\textit{massa inicial})} * 100 \quad (\textit{Equação 1})$$

Este método quantifica a atividade enzimática através da análise da percentagem de perda de peso, o que significa que quanto maior for a percentagem de perda de peso registada maior será a atividade da enzima.

3.2.4.2. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA CELULASE ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DA PERCENTAGEM DE CORANTE REMOVIDA NO DECORRER DO TRATAMENTO

Após a conclusão do tratamento com celulases descrito em 3.2.3., foi recolhida uma amostra da solução de tratamento. A amostra foi de seguida levada à ebulição durante o tempo necessário para evaporar todo o solvente. Por fim adicionou-se ácido sulfúrico a 75% ao resíduo seco obtido e agitou-se a solução até à sua completa solubilização.

A solução assim obtida foi de seguida analisada no espectrofotómetro Shimadzu UV-2101PC determinando-se a absorvância da solução ao comprimento de onda de 509nm.

Com base na absorvância da solução e na curva de calibração do corante Azul Brillhante Sumifix R Especial determinou-se a concentração de corante em solução e a partir daí a massa de corante removida no decorrer do tratamento.

Por fim determinou-se a percentagem de corante removido no decorrer do tratamento, utilizando esse valor como indicador indireto da atividade enzimática da celulase, sendo esta tão mais intensa quanto maior a percentagem de corante removido no decorrer do tratamento.

3.2.4.3. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CELULASE ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DO KIT DA MEGAZYME

Para utilizar o kit em questão foi aplicado o protocolo descrito no Anexo I.

Após a preparação das soluções descritas no anexo I, procedeu-se à recolha e diluição das celulases a testar, ou seja, das enzimas Newcell CR, Newcell Sp. Conc. CR e Base Newcell. Posteriormente, foi preparado o reagente CellG5, denominado de substrato e preparada a diluição da celulase padrão que vem com o kit.

Após a preparação das soluções previamente descritas, dispensou-se 0,10 mL de CellG5 diretamente em tubos de ensaio e pré-incubou-se a 40 °C durante 3 min. Ao mesmo tempo pré-incubou-se as soluções das celulases diluídas (a que veio com o kit e as 3 celulases a testar), também a 40 °C durante 3 min. Posteriormente, a cada tubo que contem o CellG5 adicionou-se 0,1 mL de cada solução de celulase já pré-incubada e voltou-se a incubar por mais 10 min a 40 °C. Transcorridos os 10 min adicionou-se 3 mL do reagente de paragem, previamente preparado tal como descrito no Anexo I, agitou-se e procedeu-se de seguida à leitura da absorvância da solução ao comprimento de onda de 400 nm. Para o ensaio em branco, não houve período de incubação e o reagente de paragem foi adicionado ao tubo antes de ser adicionada a enzima, de forma a que esta não fosse de todo ativada. Posteriormente foi também lida a absorvância da solução ao comprimento de onda de 400 nm.

Por fim foi calculada a atividade enzimática através da aplicação da equação 2, medida em Unidades CellG5 /mL.

$$\text{Atividade enzimática} = \Delta\text{Abs}_{400} * 8,84 * \text{Diluição (Equação 2)}$$

O resultado obtido através da aplicação da equação 2 representa a atividade enzimática. Esta é definida, quando na presença de excesso de β -glucosidase no meio, pela quantidade de enzima necessária para libertar 1 μ mol de 4-nitrophenol do kit CellG5 em 1 minuto.

3.2.5. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA AMILASE

Para quantificar a atividade enzimática da amilase decidiu-se substituir a escala TEGEWA por um modelo matemático que relaciona a concentração de amido no substrato com a intensidade colorística (K/S) da cor obtida após deposição de uma gota de uma solução de iodo/iodeto de potássio sobre o material.

Para tal, procedeu-se à encolagem de 8 amostras de tecido 100% algodão branqueado, de forma a que as mesmas apresentassem uma concentração de amido de 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5% e 3% respetivamente. O encolante foi aplicado por impregnação num *foulard Roaches* utilizando uma taxa de expressão de 80%.

Depois de encoladas as amostras, procedeu-se à preparação de uma solução de iodo/iodeto de potássio, adicionando 10 g de iodeto de potássio e 0,65 g de iodo a 100 mL de água destilada, agitando bem até obter uma solução homogénea. De seguida adicionou-se água destilada até perfazer o volume de 800 mL e por fim etanol até perfazer o volume de 1 L. Concluída a preparação da solução, cortaram-se pequenas amostras dos tecidos previamente encolados colocando-as de seguida num gobelé, em contacto com a solução de iodo, mantendo a solução em agitação durante 1 min. Transcorrido esse tempo colocou-se a amostra de algodão num outro gobelé com água durante 20 segundos, removendo de seguida o excesso de água com papel absorvente, após o que se procedeu imediatamente à determinação do espectro K/S das amostras num espectrofotómetro de refletância DATACOLOR 4660.

Pela análise dos espectros K/S obtidos, identificou-se o comprimento de onda de 580 nm como sendo aquele ao qual o valor de K/S é máximo.

Por fim, determinou-se o modelo de regressão linear que melhor descreve a relação entre o valor K/S ao comprimento de onda de 580 nm e a concentração de amido presente no material.

CAPÍTULO 4: APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1. RESULTADOS OBTIDOS NOS TRATAMENTOS ENZIMÁTICOS COM CELULASES

4.1.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CORANTE NOS TECIDOS DE ALGODÃO E VISCOSE

Para determinação da concentração de corante nos dois substratos tingidos, determinou-se a curva de calibração do corante Azul Brilhante Sumifix R Especial em Ácido Sulfúrico a 75% a partir das 6 soluções padrão indicadas na secção 3.2.2., tendo-se obtido os resultados apresentados na figura 5.

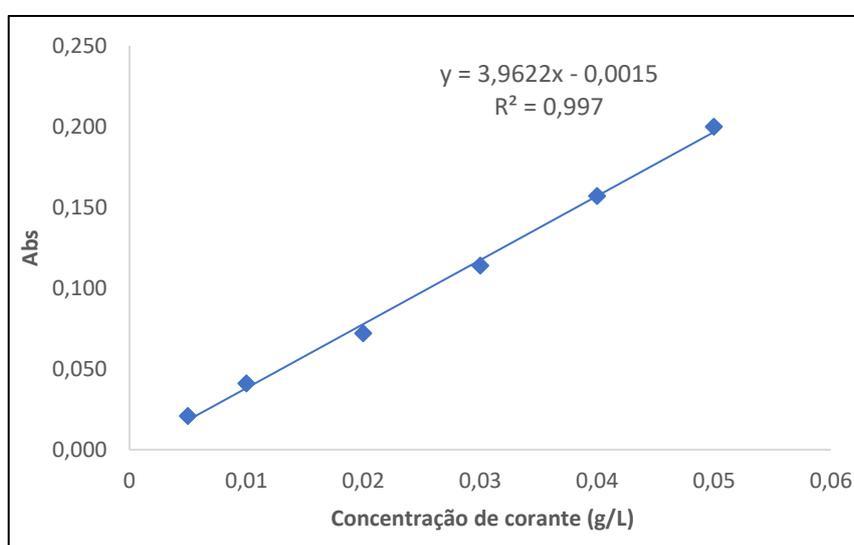


FIGURA 5-CURVA DE CALIBRAÇÃO DO CORANTE AZUL BRILHANTE SUMIFIX R ESPECIAL EM H₂SO₄ A 75%

Posteriormente, determinou-se a concentração de corante no material tingido, através da dissolução em 100 mL de ácido sulfúrico a 75% de amostras com 1 g dos 2 materiais tingidos (algodão e viscose). Após completa dissolução das amostras, mediu-se a absorvância das soluções assim obtidas ao comprimento de onda de 509nm, tendo-se obtido os resultados apresentados na tabela 3.

TABELA 3-RESULTADOS OBTIDOS NA DISSOLUÇÃO DOS MATERIAIS TINGIDOS EM H₂SO₄

Material tingido	Abs	Concentração corante em solução (g/L)	Massa de corante no material tingido (g)	Concentração de corante no material (g/Kg)
Algodão	0,256	0,0650	0,00650	6,50
Viscose	0,241	0,0612	0,00612	6,12

4.1.2. ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS CELULASES POR AVALIAÇÃO DA PERCENTAGEM DE PESO PERDIDO NO TRATAMENTO

Numa primeira etapa foram realizados os ensaios indicados na secção 3.2.3., aplicando as 3 enzimas testadas isoladamente, sem adição de molhantes nem de sequestrantes, tendo-se obtido os resultados indicados nas tabelas 4 e 5.

TABELA 4-AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS CELULASES NO TRATAMENTO DO ALGODÃO NA AUSÊNCIA DE MOLHANTES E AGENTES SEQUESTRANTES.

	Amostras	Peso inicial (g)	Peso final (g)	%peso perdido	% peso médio perdido
Newcell Sp. Cr Conc	1	4,999	4,947	1,04%	1,04%
	2	5,007	4,955	1,04%	
Newcell CR	3	5,006	4,966	0,80%	0,71%
	4	5,002	4,971	0,62%	
Base Newcell	5	5,007	4,926	1,62%	1,36%
	6	5,005	4,95	1,10%	
Branco	7	5,006	4,976	0,60%	0,68%
	8	5,007	4,969	0,76%	

TABELA 5-AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS CELULASES NO TRATAMENTO DA VISCOSES NA AUSÊNCIA DE MOLHANTES E AGENTES SEQUESTRANTES.

	Amostras	Peso inicial (g)	Peso final (g)	%peso perdido	% peso médio perdido
Newcell Sp. Cr Conc	1	5,003	4,961	0,84%	1,14%
	2	5,001	4,929	1,44%	
Newcell CR	3	5,007	4,951	1,12%	1,06%
	4	5,008	4,958	1,00%	
Base Newcell	5	5,008	4,894	2,28%	2,27%
	6	5,006	4,893	2,26%	
Branco	7	5,007	4,94	1,34%	1,11%
	8	5,007	4,963	0,88%	

Os resultados obtidos através da avaliação da percentagem de peso perdido, quer no tratamento do algodão quer da viscose, são coerentes com as concentrações das enzimas utilizadas, uma vez que a ordem crescente de concentrações das celulases estudadas é a seguinte: Newcell CR < Newcell Sp. Cr Conc < Base Newcell, podendo-se observar nas tabelas 4 e 5 que a maior perda percentual de peso médio corresponde à enzima Base Newcell e que a menor perda percentual de peso médio

corresponde à enzima Newcell CR. Nota-se no entanto a ocorrência de uma perda de peso no ensaio em branco muito próxima dos resultados obtidos nos ensaios realizados com a enzima Newcell CR no caso do tratamento do algodão e Newcell CR e Newcell Sp CR Conc no caso da viscose, facto que não seria à partida expectável, no ensaio em branco, uma vez que a solução de tratamento não incluía nenhum tipo de enzima. Estes resultados devem-se provavelmente a erros associados ao método utilizado, o qual revela fragilidades no que se refere à exatidão dos resultados fornecidos, em especial quando as amostras não são adequadamente acondicionadas em atmosfera padronizada antes de cada uma das pesagens realizadas.

Numa segunda etapa realizaram-se novos ensaios nas condições descritas na secção 3.2.3., avaliando-se agora a atividade enzimática na presença de agentes molhantes e sequestrantes, cujos resultados se apresentam nas tabelas 6 e 7.

TABELA 6-AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS CELULASES NO TRATAMENTO DO ALGODÃO NA PRESENÇA DE MOLHANTES E AGENTES SEQUESTRANTES

Resultados peso (gramas) - Algodão					
	Amostras	Peso inicial (g)	Peso final (g)	%peso perdido	% peso médio perdido
Newcell Sp. CR Conc	1	5,004	4,959	0,90%	1,19%
	2	5,006	4,932	1,48%	
Newcell CR	3	5,003	4,994	0,18%	0,36%
	4	5,004	4,977	0,54%	
Base Newcell	5	5,001	4,92	1,62%	1,67%
	6	5,004	4,918	1,72%	
Newcell CR + Toxome WET	7	5,002	4,99	0,24%	0,14%
	8	5,001	4,999	0,04%	
Newcell CR + Toxal 17N	9	5,004	5,021	-0,34%	-0,14%
	10	5,007	5,004	0,06%	
Newcell Sp. CR Conc + Toxome WET	11	5,006	4,955	1,02%	0,98%
	12	5,006	4,959	0,94%	
Newcell Sp. CR Conc + Toxal 17N	13	5,008	4,94	1,36%	1,35%
	14	5,006	4,939	1,34%	
Base Newcell + Toxome WET	15	5,004	4,942	1,24%	1,25%
	16	5,006	4,943	1,26%	
Base Newcell + Toxal 17N	17	5,008	4,914	1,88%	1,70%
	18	5,006	4,93	1,52%	
Branco	19	4,998	5,004	-0,12%	-0,06%
	20	4,998	4,998	0,00%	
Toxome WET	21	4,999	4,999	0,00%	0,07%
	22	4,999	4,992	0,14%	
Toxal 17N	23	5,001	4,989	0,24%	0,16%
	24	5,003	4,999	0,08%	

Tal como se verificou na aplicação isolada das enzimas, também os resultados apresentados na tabela 6 demonstram coerência entre a percentagem de peso médio perdido e as concentrações das enzimas utilizadas. No entanto, no conjunto de ensaios cujos resultados se apresentam na tabela 6, procedeu-se também à avaliação da influência de mais duas variáveis, o molhante TOXOME WET e o sequestrante TOXAL 17N, na atividade enzimática das celulases em estudo.

Assim, no que se refere ao tratamento do algodão, verifica-se que a enzima Newcell CR na presença do molhante TOXOME WET e do sequestrante TOXAL 17N diminui a sua atividade enzimática, uma vez que apresenta uma menor percentagem de peso médio perdido comparativamente com o resultado obtido na ausência do sequestrante e do molhante. É também possível observar que a amostra tratada com a Newcell CR, na presença do sequestrante TOXAL 17N apresenta uma massa final superior à massa inicial, sendo que esta situação apenas se pode justificar pelo facto de a taxa de humidade residual no material ser diferente nas duas pesagens influenciando assim o seu peso final o que mais uma vez demonstra a reduzida fiabilidade deste método de análise. Verifica-se também que a atividade enzimática das enzimas Newcell Sp. CR Conc e Base Newcell, diminui na presença do molhante TOXOME WET, uma vez que se observa uma diminuição da percentagem de peso médio perdido comparativamente com a amostra tratada na ausência do molhante. No entanto, ambas as enzimas exibem uma maior atividade quando aplicadas presença do sequestrante, TOXAL 17N uma vez que se regista nessas condições um aumento da percentagem de peso médio perdido. Foram também realizados ensaios apenas com o sequestrante e com o molhante, para servir de controlo, tendo-se observado que por si só o molhante TOXOME WET não induz praticamente nenhuma alteração no peso do material quando aplicado sozinho. Este resultado deveria ser semelhante ao obtido no caso do tratamento apenas com o sequestrante TOXAL 17N, tendo-se, no entanto, registado neste caso uma ligeira perda de peso do material tratado, provavelmente devido às diferentes taxas de humidade que o material apresentava nos dois momentos em que as amostras foram pesadas. Por fim, o ensaio em branco apresentou um ganho de peso de reduzida dimensão, facto que não seria expectável, uma vez que a ação abrasiva exercida pelas esferas, por si só já deveria provocar uma ligeira redução de peso da amostra. Não tendo sido isso aquilo que se observou, somos levados a concluir que as amostras apresentavam taxas de humidade diferentes nos dois momentos em que foram pesadas, o que mais uma vez evidencia a reduzida fiabilidade deste método.

No que se refere ao tratamento da viscose, os resultados apresentados na tabela 7 demonstram também coerência entre a percentagem de peso médio perdido e as concentrações das enzimas utilizadas. As enzimas Newcell CR e Newcell Sp. CR Conc., quando aplicadas na presença do molhante TOXOME WET e do sequestrante TOXAL 17N, manifestam um aumento da sua atividade enzimática uma vez que se regista uma maior percentagem de peso médio perdido comparativamente com as amostras que foram tratadas na ausência do sequestrante e do molhante. Já no que se refere à atividade enzimática da enzima Base Newcell, verifica-se que a mesma diminui ligeiramente na presença do molhante TOXOME WET e aumenta também ligeiramente na presença do sequestrante TOXAL 17N, uma vez que se regista um aumento da percentagem de peso médio perdido quando comparado com a amostra tratada na ausência de sequestrante e molhante. Relativamente aos resultados obtidos nos ensaios realizados apenas com TOXAL 17N e TOXOME WET, seria expectável não observar grande influência na perda de peso médio da fibra, dado que os ensaios foram realizados com somente molhante e sequestrante, sem aplicação de enzima. No entanto observaram-se perdas de peso das amostras tratadas de magnitude semelhante à obtida nos ensaios realizados com enzimas, o que leva a concluir que essas diferenças de peso se possam dever às diferentes taxas de humidade que as amostras apresentavam nos dois momentos em que foram pesadas.

É também importante realçar que as diferenças detetadas entre a maioria dos tratamentos realizados é de reduzida magnitude, o que face à margem de erro associado ao método utilizado poderá fazer com que as mesmas não tenham significância estatística.

Com base nos resultados obtidos é assim possível concluir que a utilização deste método de avaliação da atividade enzimática das celulasas apresenta sérias fragilidades que colocam em causa a sua utilidade no estudo da otimização dos processos de tratamento. De forma a reduzir os erros associados, as amostras deveriam ser armazenadas durante pelo menos 24h em atmosfera padronizada, antes de se proceder a cada uma das pesagens realizadas no decorrer do processo. Esta necessidade levanta, no entanto, problemas de ordem logística e torna o processo bastante moroso, o que coloca em causa a sua aplicabilidade na prática industrial.

Relativamente aos resultados obtidos no que diz respeito à influência de agentes sequestrantes e molhantes na atividade enzimática das celulasas, estes vão de encontro ao que está descrito na literatura. Miyano (1985) afirma que agentes sequestrantes podem ativar algumas enzimas, especialmente as celulasas, ao sequestrar os iões metálicos inibidores presentes na solução de

tratamento, no entanto os mecanismos que provocam essa interferência na ação enzimática das enzimas ainda não estão bem explicados (de Cassia Pereira, 2017). Relativamente à ação dos agentes molhantes, está descrito na literatura que os mesmos podem atuar como inibidores de reações bioquímicas, nomeadamente de reações enzimáticas (A. Cavaco-Paulo, 2003).

TABELA 7-AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS CELULASES NO TRATAMENTO DA VISCOSE NA PRESENÇA DE MOLHANTES E AGENTES SEQUESTRANTES.

Resultados peso (gramas) - Viscose					
	Amostras	Peso inicial (g)	Peso final (g)	% peso perdido	% peso médio perdido
Newcell Sp. CR Conc	1	5,005	4,819	3,72%	3,56%
	2	5,002	4,832	3,40%	
Newcell CR	3	4,994	4,808	3,72%	3,44%
	4	4,999	4,841	3,16%	
Base Newcell	5	5,007	4,796	4,21%	4,23%
	6	5,004	4,792	4,24%	
Newcell CR + Toxome WET	7	5,005	4,823	3,64%	3,87%
	8	5,006	4,801	4,10%	
Newcell CR + Toxal 17N	9	5,005	4,829	3,52%	3,64%
	10	5,006	4,818	3,76%	
Newcell Sp. CR Conc + Toxome WET	11	5,001	4,825	3,52%	3,69%
	12	4,998	4,805	3,86%	
Newcell Sp. CR Conc + Toxal 17N	13	5,001	4,821	3,60%	3,57%
	14	5,002	4,825	3,54%	
Base Newcell + Toxome WET	15	5,002	4,798	4,08%	4,17%
	16	5,002	4,789	4,26%	
Base Newcell + Toxal 17N	17	5,004	4,796	4,16%	4,34%
	18	5,002	4,776	4,52%	
Branco	19	5,000	4,814	3,72%	3,72%
	20	4,985	4,800	3,71%	
Toxome WET	21	5,006	4,826	3,60%	3,49%
	22	5,003	4,834	3,38%	
Toxal 17N	23	5,005	4,842	3,26%	3,28%
	24	5,002	4,837	3,30%	

4.1.3. ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS CELULASES ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DA PERCENTAGEM DE CORANTE REMOVIDO DURANTE O TRATAMENTO

Neste método de análise da atividade enzimática das celulases através da avaliação da percentagem de corante removido durante o tratamento, recorreu-se à utilização da curva de calibração apresentada na secção 4.1.1. e à leitura da absorvância das soluções obtidas através do método descrito na secção 3.2.4.2. Numa primeira etapa foram realizados os ensaios descritos na secção 3.2.3. testando as 3 enzimas, na ausência de molhantes e de sequestrantes, tendo-se obtido os resultados apresentados nas tabelas 8 e 9.

TABELA 8-AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS CELULASES NO TRATAMENTO DO ALGODÃO, ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO DA PERCENTAGEM DE CORANTE REMOVIDO NO TRATAMENTO

Enzimas	Abs lida	Concentração de corante em solução (mg/L)	Massa de corante removido (mg)	Percentagem corante removido (%)
Newcell Sp. CR Conc	0,0436	11,379	1,138	1,75
Newcell CR	0,0388	10,169	1,017	1,56
Base Newcell	0,0506	13,153	1,315	2,02
Sem enzima (Branco)	0,0267	7,105	0,710	1,09

TABELA 9-AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS CELULASES NO TRATAMENTO DA VISCOSE, ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO DA PERCENTAGEM DE CORANTE REMOVIDO NO TRATAMENTO

Enzimas	Abs lida	Concentração de corante em solução (mg/L)	Massa de corante removido (mg)	Percentagem corante removido (%)
Newcell Sp. CR Conc	0,0289	7,669	0,767	1,25
Newcell CR	0,0155	4,282	0,428	0,70
Base Newcell	0,0545	14,121	1,412	2,31
Sem enzima (Branco)	0,0056	1,782	0,178	0,29

Os resultados obtidos através da utilização deste método são coerentes com as concentrações das enzimas utilizadas para ambas as fibras, ou seja, a percentagem de corante removido pela enzima Newcell CR é menor que a percentagem removida pela enzima Newcell Sp CR Conc e pela Base Newcell. O ensaio em branco foi aquele que removeu uma menor percentagem de corante das fibras, tal como seria expectável, uma vez que não foi utilizada qualquer enzima nesse ensaio.

Na 2ª etapa foram realizados os ensaios descritos na secção 3.2.3., tendo-se obtido os resultados apresentados nas tabelas 10 e 11. Nesta 2ª etapa a atividade enzimática foi também avaliada na presença do molhante TOXOME WET e do sequestrante TOXAL 17N, dois auxiliares que são normalmente utilizados juntamente com as celulases nos processos industriais, de forma a avaliar a sua influência na atividade enzimática.

TABELA 10-AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS CELULASES NO TRATAMENTO DO ALGODÃO, NA PRESENÇA DE MOLHANTES E SEQUESTRANTES, ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO DA PERCENTAGEM DE CORANTE REMOVIDO NO TRATAMENTO.

Enzimas	Abs lida	Concentração de corante em solução (mg/L)	Massa de corante removido (mg)	Percentagem corante removido (%)
Newcell Sp. CR Conc	0,0382	10,008	1,001	1,540
Newcell CR	0,0298	7,911	0,791	1,217
Base Newcell	0,0404	10,573	1,057	1,627
Newcell CR + Toxome WET	0,0199	5,411	0,541	0,833
Newcell CR + Toxal 17N	0,0206	5,573	0,557	0,857
Newcell Sp. CR Conc + Toxome WET	0,0417	10,895	1,090	1,676
Newcell Sp. CR Conc + Toxal 17 N	0,0445	11,621	1,162	1,788
Base Newcell + Toxome WET	0,0439	11,460	1,146	1,763
Base Newcell + Toxal 17N	0,0458	11,944	1,194	1,837
Branco	0,0241	6,460	0,646	0,994
Toxome WET	0,0267	7,105	0,710	1,093
Toxal 17N	0,0308	8,153	0,815	1,254

De acordo com os resultados da tabela 10, verificou-se que a celulase Newcell CR tem uma menor atividade enzimática que a Newcell Sp. CR Conc e que esta tem uma menor atividade enzimática quando comparada com a Base Newcell, sendo estes resultados coincidentes com as respetivas concentrações enzimáticas de cada celulase.

O TOXOME WET e o TOXAL 17N quando aplicados juntamente com a Newcell CR influenciam negativamente a sua atividade, tal como se pode verificar pela menor percentagem de corante removido nessas condições. Relativamente às enzimas Newcell Sp. CR Conc e Base Newcell verificou-se o contrário, uma vez que quando aplicadas juntamente com o TOXOME WET e o TOXAL 17N a sua atividade enzimática é potenciada, tal como se comprova pelo incremento da percentagem de corante removido nestas condições quando comparada com os ensaios em que só são aplicadas as enzimas.

O ensaio em branco caracteriza-se por ser um ensaio em que não foi adicionada nenhuma enzima e que depende exclusivamente da ação mecânica das esferas, que por si só já remove algum do corante presente no material. Relativamente aos resultados obtidos nos ensaios realizados com apenas TOXAL 17N e TOXOME WET, observou-se uma situação semelhante ao ensaio em branco, ou seja, a percentagem de corante removido deveu-se apenas à ação mecânica das esferas, dado que os ensaios foram realizados com somente molhante e sequestrante, sem aplicação de enzima.

TABELA 11-AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS CELULASES NO TRATAMENTO DA VISCOSE, NA PRESENÇA DE MOLHANTES E SEQUESTRANTES, ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO DA PERCENTAGEM DE CORANTE REMOVIDO NO TRATAMENTO.

Enzimas	Abs lida	Concentração de corante em solução (mg/L)	Massa de corante removido (mg)	Percentagem corante removido (%)
Newcell Sp. CR Conc	0,0267	7,105	0,710	1,161
Newcell CR	0,0142	3,960	0,396	0,647
Base Newcell	0,0461	12,024	1,202	1,965
Newcell CR + Toxome WET	0,0135	3,798	0,380	0,621
Newcell CR + Toxal 17N	0,0206	5,573	0,557	0,911
Newcell Sp. CR Conc + Toxome WET	0,0302	7,992	0,799	1,306
Newcell Sp. CR Conc + Toxal 17 N	0,0279	7,427	0,743	1,214
Base Newcell + Toxome WET	0,0378	9,927	0,993	1,622
Base Newcell + Toxal 17N	0,0656	16,944	1,694	2,769
Branco	0,0078	2,347	0,235	0,383
Toxome WET	0,0084	2,508	0,251	0,410
Toxal 17N	0,0104	2,992	0,299	0,489

Os resultados obtidos no tratamento da viscose com celulases estão representados na tabela 11. Tal como no algodão, a percentagem de corante removido no decorrer do tratamento é proporcional à concentração de cada enzima em estudo. No entanto, no caso da viscose verifica-se que a Newcell CR e a Base Newcell quando aplicadas juntamente com o molhante TOXOME WET diminuem a sua atividade enzimática, ou seja, a percentagem de corante removido diminui, no entanto quando aplicadas juntamente com o TOXAL 17N, a sua atividade enzimática é potenciada, dado que a percentagem de corante removido aumenta, isto quando comparado à performance das enzimas quando aplicadas sozinhas. Por sua vez, a atividade da enzima Newcell Sp CR Conc é sempre potenciada quando aplicada juntamente com o TOXOME WET e o TOXAL 17N. O ensaio em branco apresenta a menor percentagem de remoção de corante, tal como seria de esperar, uma vez que não foi, neste caso, utilizada qualquer enzima. Relativamente aos ensaios realizados com TOXOME WET ou TOXAL 17N verifica-se que a percentagem de corante removido é da mesma ordem de grandeza

da obtida no ensaio em branco, sendo este resultado expectável, dado o facto de não existir nenhuma enzima na solução de tratamento, pelo que a percentagem de corante removido resulta apenas da ação abrasiva das esferas colocadas em cada uma das soluções de tratamento. Relativamente aos resultados obtidos no que diz respeito à influência de agentes sequestrantes e molhantes na atividade enzimática das celulases, estes vão de encontro ao que está descrito na literatura. O autor Miyano, 1985, afirma que agentes sequestrantes podem ativar algumas enzimas, especialmente as celulases, ao sequestrar os iões metálicos inibidores presentes no sistema aquoso, no entanto relativamente à ação dos agentes molhantes, está descrito na literatura que os mesmos podem ser inibidores de ações bioquímicas, nomeadamente de ações enzimáticas (A. Cavaco-Paulo, 2003).

4.1.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS CELULASES ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DO KIT DA MEGAZYME – “CELLULASE ASSAY KIT (CELLG5 METHOD)”

TABELA 12-RESULTADOS OBTIDOS NA APLICAÇÃO DO KIT DA MEGAZYME

Enzimas	Abs	Atividade enzimática	Média (Unidades CellG5/mL)
Newcell CR (B)	0,068	6,011	52,2
Newcell CR (1)	0,599	52,952	
Newcell CR (2)	0,582	51,449	
Newcell Sp. CR Conc (B)	0,068	6,011	173,087
Newcell Sp. CR Conc (1)	1,933	170,877	
Newcell Sp. CR Conc (2)	1,983	175,297	
Base Newcell (B)	0,067	5,923	187,187
Base Newcell (1)	2,138	188,999	
Base Newcell (2)	2,097	185,375	
Padrão (B)	0,067	5,923	137,418
Padrão (1)	1,555	137,462	
Padrão (2)	1,554	137,374	

Foi implementado o método para quantificação da atividade enzimática da celulase através da aplicação do kit da Megazyme – “Cellulase assay kit” e os resultados obtidos encontram-se representados na tabela 12. As leituras das absorvâncias foram feitas ao comprimento de onda de 400nm.

A aplicação deste método foi realizada na avaliação da atividade enzimática das enzimas Newcell CR, Newcell Sp. CR Conc., Base Newcell e enzima padrão que veio com o kit. Foram também realizados ensaios em branco identificados na tabela 12 pela letra B, tendo os ensaios que integravam enzimas na solução de tratamento sido realizados em duplicado. Pela análise dos resultados apresentados concluiu-se que quanto maior a concentração da celulase, maior será a sua atividade enzimática, podendo as enzimas ser ordenadas por ordem crescente de atividade da seguinte forma: Newcell CR < Newcell Sp. CR Conc < Base Newcell.

É de realçar que neste caso não se avaliou a atividade enzimática na presença de molhantes e sequestrantes, uma vez que o kit utilizado não permite que nas soluções preparadas para análise sejam integrados outros reagentes para além da enzima a testar. Esta restrição constitui um dos pontos fracos deste tipo de kits que impossibilita a sua utilização em estudos de otimização de processos que envolvem a utilização de outros tipos de reagentes que não apenas as enzimas.

Tal como explicado previamente, 1 unidade de atividade enzimática caracteriza-se, quando na presença de excesso de β -glucosidase no meio, pela quantidade de enzima necessária para libertar 1 μ mol de 4-nitrophenol do kit CellG5 em 1 minuto. Ora, isto significa que no caso da Newcell Cr obteve-se uma atividade enzimática de 52 unidades de CellG5/mL, libertando para o meio 52 μ mol de 4-nitrophenol de CellG5 em 1 minuto, apresentando uma menor atividade enzimática que a Newcell Sp. CR Conc que obteve uma atividade enzimática de 173 unidades de CellG5/mL libertando para o meio 173 μ mol de 4-nitrophenol de CellG5 em 1 minuto que, por sua vez, apresentou uma atividade enzimática inferior à enzima Base Newcell que exibiu uma atividade enzimática de 187 unidades de CellG5/mL, libertando para o meio 187 μ mol de 4-nitrophenol de CellG5 em 1 minuto. Resumindo, quanto maior a atividade enzimática, mais nitrofenol se vai libertar em 1 minuto e mais intensa será a coloração final da solução, apresentando por isso uma absorvância maior. A enzima padrão demonstra que o kit se encontra funcional.

4.2. RESULTADOS OBTIDOS NO TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM A AMILASE

4.2.1. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA COR DO COMPLEXO AMIDO-iodo

No decorrer da avaliação do teor de amido presente nos substratos verificou-se que a cor do complexo amido-iodo que se formava após a deposição da gota da solução de iodo/iodeto de potássio diminuía progressivamente de intensidade à medida que o tempo passava. Para avaliar este comportamento, monitorizou-se numa amostra com 3% de amido, a evolução do respetivo espectro K/S ao longo do tempo, com intervalos de tempo de 30 segundos, durante um período de 10 minutos, tendo-se obtido os resultados apresentados na figura 6, confirmando-se pela análise dos mesmos que a intensidade da cor diminui de forma rápida e progressiva, razão pela qual a análise deve ser realizada no mais curto espaço de tempo possível.

Uma análise mais detalhada da evolução dos valores K/S obtidos ao comprimento de onda de 580 nm, permitiu detetar a existência de uma correlação linear entre a intensidade colorística e o tempo de ensaio decorrido, tal como se pode constatar pela análise dos dados apresentados na figura 7.

De forma a generalizar estes resultados para outras situações nas quais a concentração de amido no material seja diferente da existente na amostra testada, determinou-se para o mesmo comprimento de onda de 580 nm a percentagem de redução do valor K/S em função do tempo, tendo-se obtido os resultados apresentados na figura 8, que comprovam que também neste caso a redução percentual da intensidade colorística em função do tempo pode ser descrita através de um modelo de regressão linear. A determinação deste modelo permite corrigir leituras do valor de K/S ao comprimento de onda de 580 nm, quando as mesmas são realizadas não imediatamente após a execução do ensaio, mas com um desfasamento de até 10 minutos, utilizando a equação 3.

Onde: $K/S_{\text{corrigido}} = K/S_{\text{obtido}} \div (1,4273 - 0,0416t)$ (Equação 3)

$K/S_{\text{obtido}} = K/S$ lido decorridos t segundos após realização do teste

$K/S_{\text{corrigido}} = K/S$ obtido imediatamente após a realização do teste

t = tempo decorrido em segundos entre a realização do teste e a leitura do valor K/S

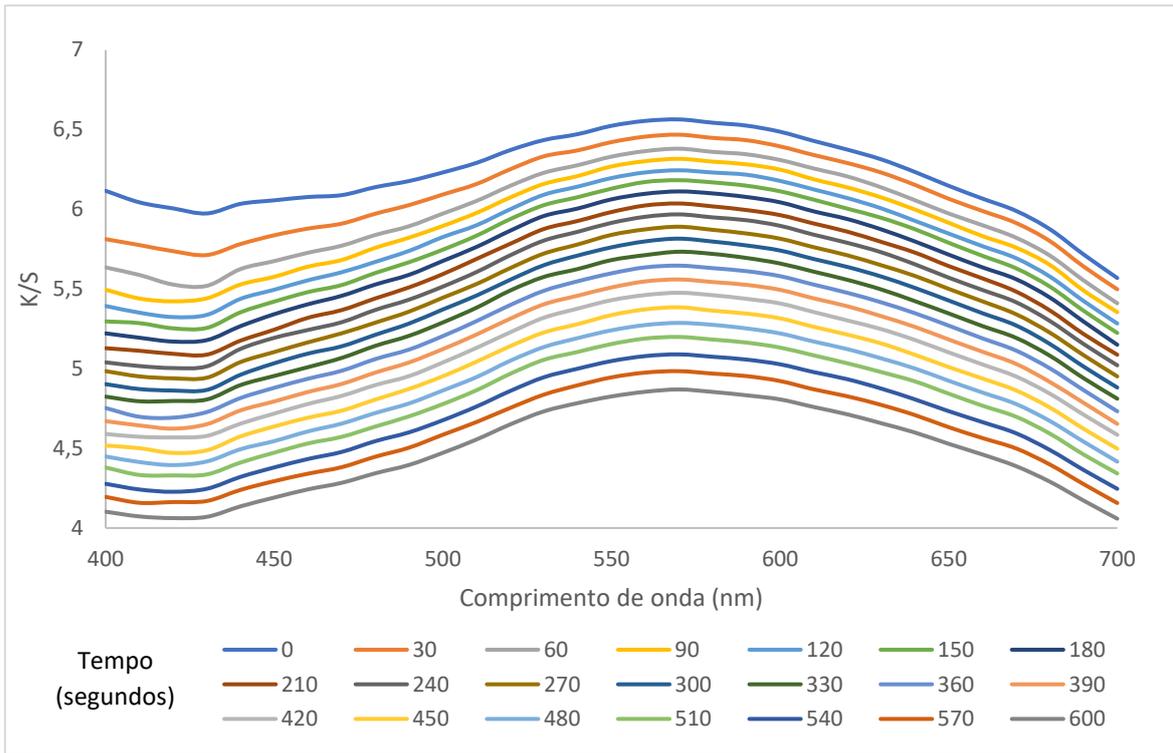


FIGURA 6-ESPECTROS K/S DA AMOSTRA TESTADA COM A SOLUÇÃO DE IODO/IODETO DE POTÁSSIO EM FUNÇÃO DO TEMPO

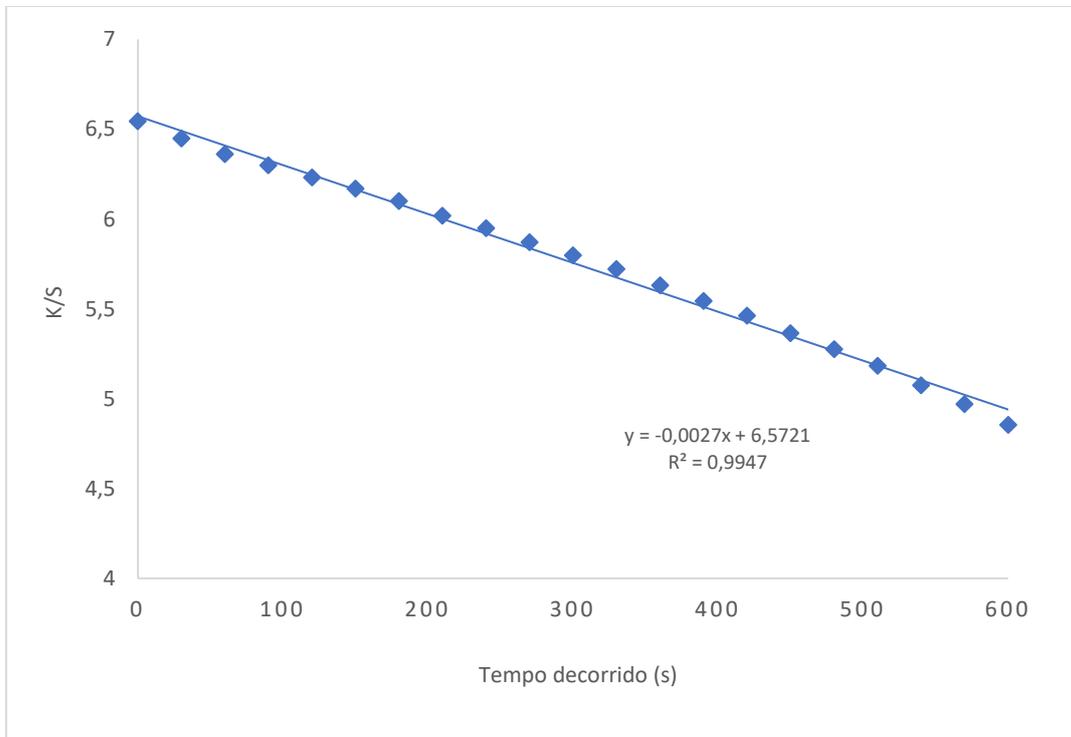


FIGURA 7-ESPECTRO K/S DA AMOSTRA TESTADA COM A SOLUÇÃO DE IODO/IODETO DE POTÁSSIO EM FUNÇÃO DO TEMPO A 580NM

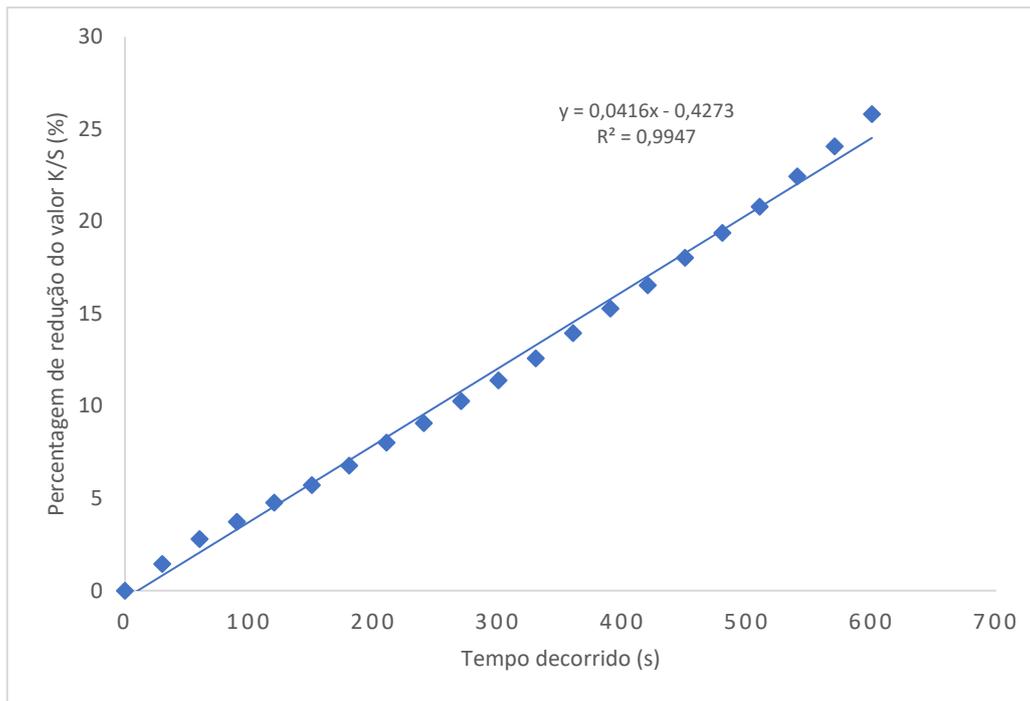


FIGURA 8-PERCENTAGEM DE REDUÇÃO DO K/S DA AMOSTRA TESTADA COM A SOLUÇÃO DE IODO/IODETO DE POTÁSSIO EM FUNÇÃO DO TEMPO A 580NM

4.2.2. MODELO MATEMÁTICO QUE ESTABELECE A RELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE AMIDO NO MATERIAL E O VALOR DE K/S DA AMOSTRA TESTADA

Após ser realizado o procedimento descrito na secção 3.2.5. foram registados os espectros K/S das amostras testadas (Figura 9).

Analisou-se de seguida a relação existente entre a concentração de amido nas amostras e o respetivo valor K/S ao comprimento de onda de 580 nm, tendo-se obtido os resultados apresentados na figura 10 que demonstram que a relação entre as duas variáveis pode ser descrita por um modelo de regressão logarítmica com um coeficiente de correlação bastante elevado ($R^2 = 0,98$).

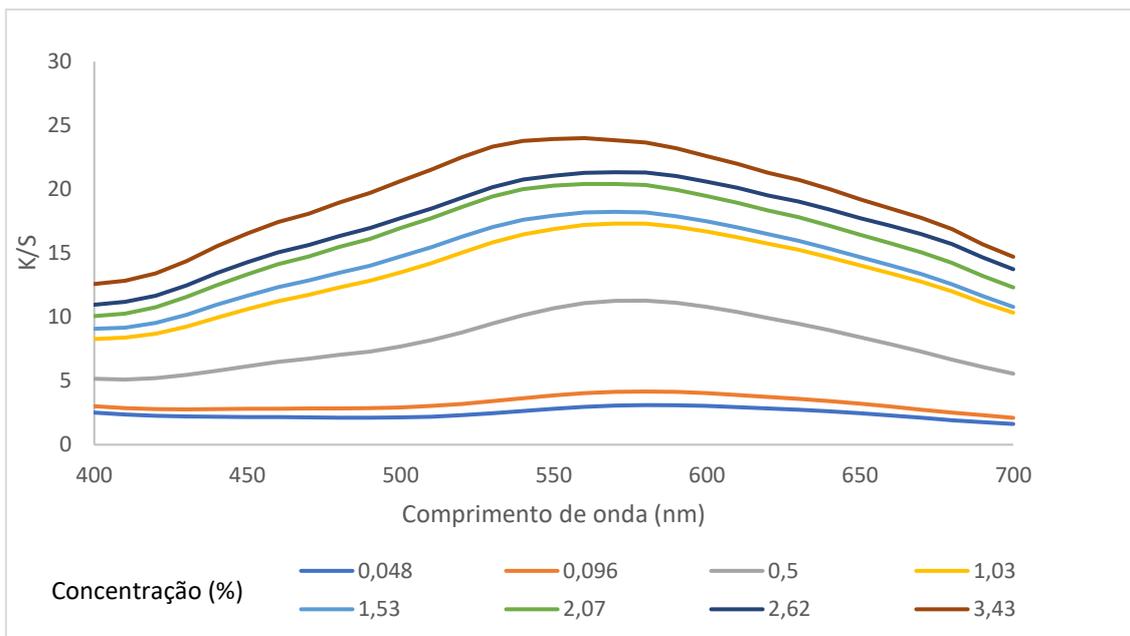


FIGURA 9-ESPECTROS K/S EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AMIDO NO MATERIAL

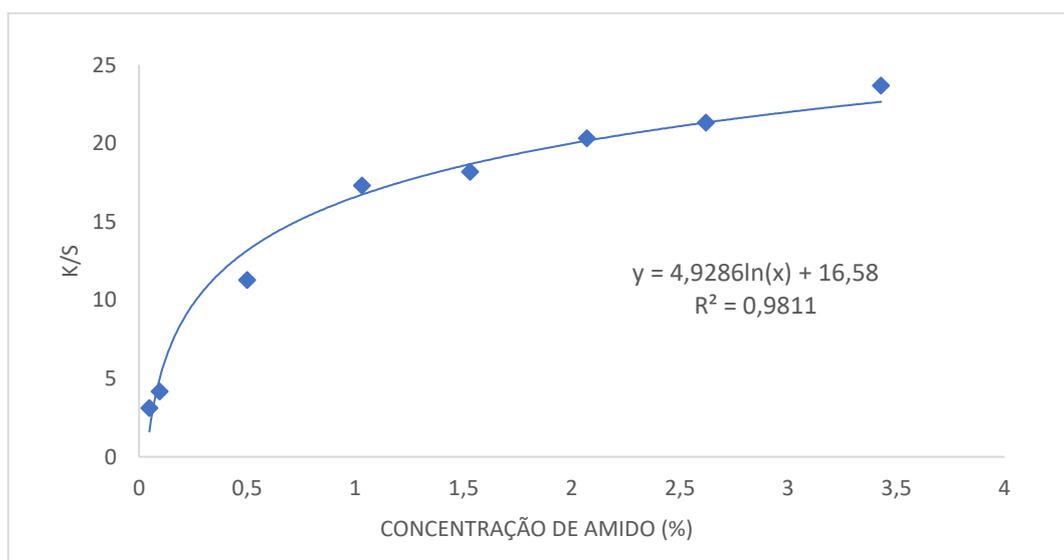


FIGURA 10-RELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE K/S AO COMPRIMENTO DE ONDA DE 580NM E A RESPECTIVA CONCENTRAÇÃO DE AMIDO NA AMOSTRA

Assim, com base no modelo desenvolvido será possível quantificar de forma objetiva a concentração de amido presente num dado material, desde que se conheça o valor K/S ao comprimento de onda de 580 nm, da amostra testada com a solução de iodo/iodeto de potássio.

A ausência de subjetividade na análise, ao contrário daquilo que acontece com o método tradicional, permite não apenas aumentar a fiabilidade da análise realizada, mas também quantificar de forma mais precisa a concentração de amido presente no material. Este pressuposto

é essencial no estudo da otimização dos processos de desengolagem, uma vez que permite identificar variações da atividade enzimática de reduzida magnitude, na maior parte das vezes impossíveis de detetar através do método clássico que envolve uma classificação baseada nos intervalos de concentração de amido representados na escala TEGEWA.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

5.1. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nesta dissertação é possível concluir que foram desenvolvidos métodos fiáveis, de fácil implementação e de rápida execução para a análise da atividade enzimática das celulasas e das amilases, na sua aplicação no âmbito do processamento têxtil.

O método para a determinação da atividade enzimática das celulasas por avaliação da diferença de peso, vulgarmente utilizado na indústria têxtil, demonstrou ser pouco preciso e incapaz de proporcionar resultados aceitáveis no âmbito da otimização dos processos de tratamento, em especial se as amostras não forem colocadas em atmosfera padrão durante 24 horas antes de cada pesagem. Caso tal acontecesse a fiabilidade do método aumentaria, mas o processo tornar-se-ia impraticável a nível industrial por se tornar demasiado moroso.

Pelo contrário, o método para quantificação da atividade enzimática das celulasas através da determinação da percentagem de corante removida no decorrer do tratamento, revelou ser de mais fácil implementação e permitiu a obtenção de resultados em períodos de tempo bastante mais curtos do que aqueles que seriam necessários para a correta implementação do método anteriormente descrito. Quanto aos resultados obtidos, verificou-se que ordenando as enzimas testadas por grau de atividade com base nos resultados fornecidos por este método e pela utilização do kit da Megazyme se obtêm resultados similares. Este por sua vez, apesar da sua suposta fiabilidade, apresenta como principais desvantagens o facto de ser relativamente mais moroso, uma vez que exige a preparação de um conjunto relativamente grande de soluções antes de se proceder à análise propriamente dita e a impossibilidade de avaliar a influência de outros reagentes na atividade enzimática das celulasas.

No que se refere à determinação da atividade enzimática das amilases, o método desenvolvido, baseia-se no método tradicionalmente utilizado pela indústria, com algumas adaptações que permitem torná-lo mais preciso e menos subjetivo. Assim, ao recorrer à análise espectrofotométrica da cor obtida após a formação do complexo amido-iodo, o processo subjetivo de avaliação da cor foi substituído por uma análise instrumental que é, não apenas mais precisa,

mas também mais reprodutível, eliminando dessa forma toda a subjetividade envolvida no processo de análise tradicional.

5.2. PERSPETIVAS FUTURAS

Os métodos agora desenvolvidos criam as condições necessárias para que se possa proceder futuramente à otimização dos processos de tratamento enzimático com amilases e celulasas. Assim, seria útil que futuramente se procedesse à avaliação da atividade enzimática destas enzimas em diferentes condições de processamento, introduzindo para o efeito alterações no processo e na composição das soluções de tratamento, de forma a proceder à sua otimização.

Seria também de grande interesse avaliar a possível combinação destes tratamentos com outros, enzimáticos ou não, tendo sempre como objetivo a redução dos tempos de processamento e a redução do consumo de energia e reagentes, diminuindo dessa forma o impacto ambiental associado ao processamento têxtil e aumentando consequentemente a sua sustentabilidade.

BIBLIOGRAFIA

- A. Cavaco-Paulo, G. G., 2003. *Textile Processing with Enzymes*. England: Woodhead Publishing Ltd.
- Anon., s.d. *Megazyme*. [Online]
Available at: <https://www.megazyme.com/cellulose-assay-kit-cellg5-method>
[Acedido em 22 maio 2021].
- Araki, H. et al., 2017. Materials and Device Designs for an Epidermal UV Colorimetric Dosimeter with Near Field Communication Capabilities. *Advanced Funcional Materials*, 12 January, 27(2), pp. 1-9.
- Bahtiyari, M. Đ., Duran, K., Körlü, A. & Perincek, S., 2008. *A PRATICAL METHOD FOR DETERMINING OF CELLULASE ACTIVITY*, Turkey: s.n.
- Bhatia, S. C. & D. S., 2017. *Pollution Control in Textile Industry*. s.l.:WPI India.
- Coleman, D. J. S. M. J. & N. J. J., 2007. A long-wavelength fluorescent substrate for continuous fluorometric. *Analytical Biochemistry*, 371(2), pp. 146-153.
- de Cassia Pereira, J. a. G. E. C. a. d. S. M. M. M. a. d. S. G. A. C. a. P. O. M. a. B. M. a. d. S. R. a. G. E. a. M. D. A. B., 2017. Effect of metal ions, chemical agents and organic compounds on lignocellulolytic enzymes activities. *Enzyme inhibitors and activators*, Volume 29, pp. 139-164.
- Erkkilä, M. J. a. L. R. a. A. H. a. C.-M. V., 1998. Allele-dependent barley grain β -amylase activity. *Plant Physiology*, 117(2), pp. 679-685.
- Ghose, T., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure and applied Chemistry*, 59(2), pp. 257-268.
- Kozicki, M. & Sasiadek, E., 2013. Scanning of flat textile-based radiation dosimeters: Influence of parameters on the quality of results. *Radiation Measurements*, Volume 58, pp. 87-93.
- Kozicki, M., Sasiadek, E., Karbownik, I. & Maniukiewicz, W., 2015. Doped polyacrylonitrile fibres as UV radiation sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 213, pp. 234-243.
- Liu, S., 2017. *Bioprocess engineering: kinetics, sustainability, and reactor design*. 2^a ed. s.l.:Elsevier.
- Miyano, H. a. T. T. a. I. K. a. N. T., 1985. Influences of metal ions on the reaction of amino and imino acids with fluorogenic reagents. *Analytical biochemistry*, 150(1), pp. 125-130.
- Mojsov, K., 2011. Application of Enzymes in the Textile INdustry: A Review. 9 a 11 Março.
- Muthu, S. S., 2014. *Roadmap to Sustainable Textiles and Clothing : Eco-friendly Raw Materials, Technologies, and Processing Methods*. 1^a ed. s.l.:Springer Singapore.
- Muthu, S. S., 2018. *Detox Fashion: Sustainable Chemistry and Wet Processing*. s.l.:Springer, Singapore.
- Nierstrasz, V. & C.-P. A., 2010. *Advances in Textile Biotechnology*. s.l.:Elsevier Science..
- Nigel Corns, S. a. P. S. M. a. T. A. D., 2009. Industrial organic photochromic dyes. *Coloration Technology*, 125(5), pp. 249-261.

- Polaina J., M. A., 2007. *Industrial Enzymes*. 2007th edition (March 30, 2007) ed. Dordrecht: Springer.
- Sasiadek, E., Andrzejczak, R. & Kozicki, M., 2012. The importance of fabric structure in the construction of 2D textile radiation dosimeters. *Radiation Measurements*, Volume 47, pp. 622-627.
- Schindler , W. D. & Hauser, P. J., 2004. *Chemical finishing of textiles*. Inglaterra: Elsevier.
- T. Shuangqi, W. Z. F. Z. Z. L. a. W. J., 2011. Determination methods of cellulase activity. *African Journal of Biotechnology*, Volume 10 (37), pp. 7122-7125.
- TAVARES, C. A. G., 2017. *MAXIMIZAÇÃO DO RENDIMENTO COLORÍSTICO NO PROCESSO DE BRANQUEIO POR PAD-STEAM*, Porto: s.n.
- Tian Shuangqi, W. Z. F. Z. Z. L. a. W. J., 2011. Determination methods of cellulase activity. 20 Julho, Volume 10 (37), pp. 7122-7125.
- Toyama, H., Yano, M., Hotta, T. & Toyama, N., 2007. Filter paper degrading ability of a Trichoderma strain with multinucleate conidia. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136-140(1-12), pp. 155-160.
- Vigneswaran, C. A. M. & K. P., 2014. *Bioprocessing of Textiles*. s.l.:WPI India.
- VIKOVÁ, M., 2004. Visual assessment of UV radiation by colour changeable textile sensors. Em: *AIC 2004 Color and Paints, Proceedings of the Interim Meeting of the International Color Association*. Brasil: Associação Brasileira da Cor Porto Alegre, pp. 129-133.
- Zhang YH, H. M. M. J., 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology advances*, 24(5), pp. 452-481.
- Zhou, X., Chen, H. & Li, Z., 2004. CMCase activity assay as a method for cellulase adsorption analysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(5), pp. 455-459.

ANEXOS

PROTOCOLO KIT MEGAZYME – CELLULASE ASSAY KIT (CELL G5 METHOD)

PREPARAÇÃO DE REAGENTES ADICIONAIS

A: Solução tampão de acetato de sódio – concentrada

1. Adicionar 60g de ácido acético glacial a 800mL de água destilada.
2. Ajustar o pH da solução para 4,5 com NaOH ou HCl e perfazer o volume até 1L com água destilada.

B: Diluição da solução tampão “A”

1. Adicionar 100mL da solução tampão A a 850mL de água destilada.
2. Ajustar o pH para 4.5 com NaOH ou HCl e perfazer o volume para 1L.
3. Adicionar 1g de BSA e dissolver bem.
4. Adicionar 0.2g de *sodium azide* e dissolver bem.

C: Solução tampão de fosfato de sódio (0,5m, pH = 6) - concentrada

1. Adicionar 156g de Ortofosfato dihidrogenio sódico a um volume de 1,5L de água destilada.
2. Ajustar o pH até 6 com NaOH e perfazer o volume até 2L com água destilada.

D: Diluição da solução tampão “C”

1. Adicionar 200mL da solução tampão C concentrada a um volume de 750mL de água destilada.
2. Ajustar o pH até 6 com HCL e perfazer o volume até 1L com água destilada.
3. Adicionar 0.2g de *sodium azide* e dissolver.

PREPARAÇÃO DO REAGENTE PARAGEM

4. Dissolver 20 g de B-TRIS500 em 900 mL de água destilada.
5. Ajustar o pH até 10 com NaOH e perfazer o volume até 1L com água destilada.

PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO E DILUIÇÃO DAS CELULASES A TESTAR

1. Adicionar 1mL da celulase a 49mL da solução tampão D e misture bem. Esta solução denominar-se-á de Extrato Original.
2. Diluir o extrato original, ou seja, adicionar 1mL do extrato original a 9mL da solução tampão D.
3. Fazer o passo 1 para as 3 enzimas a testar (Newcell CR, Newcell Sp. Conc. CR, Base Newcell).

PREPARAÇÃO REAGENTE CELLG5 (substrato)

1. Transferir 100 µL de solução do frasco 2 para o frasco 1 e misturar bem.

PREPARAÇÃO DILUIÇÃO CELULASE STANDARD

1. Dispensar 0.5mL da solução presente no frasco 3 para 9.5mL de solução tampão B e misturar bem.

PROCEDIMENTO ENSAIO CELULASE

1. Dispensar 0.10mL da CellG5 diretamente para todos os tubos de vidro de 13mL do ensaio e pré-incubar a 40°C durante aprox. 3 min.
2. Ao mesmo tempo, pré-incubar as soluções de celulase diluída, quer a standard quer as celulases a testar, a 40°C durante 3 min.
3. A cada tubo que contem a CellG5 adicionar 0.1mL de solução de celulase e incubar 10 min a 40°C.
4. Transcorridos os 10 min adicionar 3.0 mL do reagente de paragem e misturar.
5. Ler a absorvância de cada tubo a um comprimento de onda de 400nm.

PROCEDIMENTO ENSAIO EM BRANCO

1. Dispensar 0.10mL da CellG5 diretamente para os tubos de vidro de 13mL do ensaio.
2. Adicionar 3.0 mL do reagente de paragem e misturar.
3. Adicionar 0.1mL de solução de celulase diluída.
4. Ler a absorvância de cada tubo a um comprimento de onda de 400nm.

CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

1 unidade de atividade é definida pela quantidade de enzima existente na presença da quantidade necessária de β -glucosidase termoestável para libertar 1 μ Lmol de *4-nitrophenol* de CellG5 em 1 minuto, denominando-se de 1 unidade de CellG5.

CellG5 Unidades/mL da preparação enzimática original:

$$= \frac{\Delta A_{400}}{\text{Incubation Time}} \times \frac{\text{Total Volume in Cell}}{\text{Aliquot Assayed}} \times \frac{1}{\epsilon_{mM}} \times \frac{\text{Extraction Vol.}}{\text{Sample Vol.}} \times \text{Dilution}$$

Onde:

- ΔA_{400} = Ansovância (reação) – Absorvância (branco)
- Tempo de incubação = 10 min
- Volume total na célula = 3.2 mL
- Aliquot = 0.1 mL
- ϵ_{mM} (4-nitrophenol) = 18.1 (a 400 nm) em 2% Tris buffer (pH 10)
- Volume de extração = 50 mL por 1.0 mL da preparação enzimática original
- Diluição do extrato original

Sendo:

CellG5 Unidades/mL da preparação enzimática original:

$$= \frac{\Delta A_{400}}{10} \times \frac{3.2}{0.1} \times \frac{1}{18.1} \times \frac{50}{1} \times \text{Dilution}$$

$$= \Delta A_{400} \times 8.84 \times \text{Dilution}$$