

Obtenção de Tecidos de Poliéster de Baixo Peso por Tratamento Enzimático

Andreia Joana da Costa Vasconcelos

Dissertação de Mestrado em Química Têxtil

Escola de Engenharia
Departamento de Engenharia Têxtil
Universidade do Minho
2005

À minha mãe

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer ao professor doutor Artur Cavaco-Paulo por todo o apoio prestado.

Ao departamento de Engenharia Têxtil da Universidade do Minho pela disponibilidade de meios físicos e técnicos indispensáveis à elaboração deste trabalho.

Ao doutor Mário Lima pela disponibilidade na execução dos ensaios de fricção.

Por fim, quero agradecer a colaboração de todos os colegas do Laboratório de Acabamentos do Departamento de Engenharia Têxtil da Universidade do Minho em especial, à Carla Manuela Silva e Andrea Zille pelas sugestões efectuadas.

RESUMO

A produção de tecidos de poliéster de baixo peso é obtida pela remoção química da parte celulósica de uma mistura poliéster/algodão. O processo convencional consiste no tratamento das misturas com uma solução de ácido sulfúrico a 75% (v/v). Os efeitos negativos dos processos químicos podem ser evitados utilizando processos enzimáticos.

Neste trabalho estudou-se a acção de uma celulase total comercial sobre um tecido 100% algodão e uma mistura poliéster/algodão (34/66%), com o objectivo de obter a degradação total da celulose. A actividade da celulase foi medida em termos de perda de peso total das amostras, e foi estudado também a influência da dosagem enzimática, acção mecânica e tempo de tratamento na actividade enzimática.

A hidrólise total da celulose do tecido 100% algodão foi atingida após 6 horas de tratamento com uma dosagem enzimática e acção mecânica elevadas. Na mistura de poliéster/algodão obteve-se uma hidrólise máxima de 55% após 9 horas de tratamento com uma dosagem enzimática e acção mecânica elevadas. Verificou-se que a flexão, a força e alongamento à ruptura diminuem com o aumento da perda de peso, e o coeficiente de atrito aumenta com o aumento da perda de peso total das amostras.

ABSTRACT

The production of light weight polyester fabrics is achieved by chemical removal of cellulose on a polyester/cotton blend. The traditional process consists on the blend treatment with a sulfuric acid solution 75% (v/v). The negative effects of the chemical processes can be avoided by enzymatic treatments.

In the present work, the mode of action of a total commercial cellulase was investigated towards a cotton fabric and polyester/cotton blend (34/66%) to achieve the total hydrolysis of cellulose. The cellulase activity was measured in terms of total weight loss, and we also studied the influence of enzyme dosage, mechanical action and treatment time on cellulase activity.

The total hydrolysis of cellulose from the cotton fabric was accomplished after 6 hours of treatment with high level of mechanical action and enzyme dosage. On the polyester/cotton blend we obtained a maximum hydrolysis of 55% after 9 hours of treatment with high level of mechanical action and enzyme dosage. It was observed that the bending and breaking strength of samples decreases, and that the friction coefficient increases with the increase of total weight loss.

ÍNDICE

	Página
I APRESENTAÇÃO DO TRABALHO	1
II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
1 - Poliéster	
1.1- Síntese do Poliéster	2
1.2- Estrutura e Morfologia	3
1.3- Propriedade Físicas	5
1.4- Propriedade Químicas	5
2 - Algodão	
2.1- Estrutura Morfológica	7
2.2 -Estrutura Molecular	9
3 - As Celulases	
3.1 - Degradação Enzimática da Celulose	12
3.2 - Sistema celulolítico produzido pelo <i>Trichoderma reesei</i>	12
3.3 - Medição da actividade enzimática	16
3.4 - Modo de acção das celulases: Sinergismo	18
3.5 - Aplicações biotecnológicas das celulases	19
3.5.1 - Biopreparação	20
3.5.2 - Processos de Envelhecimento	21
3.5.3 - Biofinishing	22
3.6- Modo de acção das celulases no algodão	24

III PARTE EXPERIMENTAL	25
1 - Materiais	
1.1 - Reagentes	25
1.2 - Enzimas	25
1.3 - Substratos	26
1.4 - Equipamentos	26
2 - Métodos	
2.1 - Determinação dos Açúcares Redutores	27
2.1.1 - Descrição do método	27
2.2 - Determinação da proteína em solução	28
2.2.1 - Descrição do método	28
2.3 - Determinação da Perda de Peso Total	30
2.4 - Determinação da Perda de Peso Insolúvel	30
2.5 - Actividade em Carboximetilcelulose (CMC)	31
2.6 - Actividade no Algodão	31
2.7 - Tratamentos Enzimáticos	31
2.8 - Determinação da Flexão dos tecidos	32
2.9 - Determinação da Força Máxima à Ruptura	33
2.10 - Análise Quantitativa de Misturas	33
2.11 - Microscopia Electrónica de Varrimento	34
2.12 - Determinação do Coeficiente de Fricção	34
2.13 - Tratamento Estatístico dos Dados	34
IV APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	37
1 - Actividade enzimática	37
2 - Tratamento do tecido 100% algodão	
2.1 - Efeito da composição celulolítica	39
2.2 - Tratamento com Celusoft L	43

3 - Tratamento da mistura poliéster/algodão	49
3.1 - Ensaio físicos	54
V CONCLUSÃO	58
VI PERSPECTIVAS FUTURAS	61
VII REFERÊNCIAS	62

I APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

O poliéster representa 62.8% do mercado mundial das fibras têxteis (Barbosa et al., 2004). Por razões de moda, existe um grande mercado para tecidos de PES de baixo peso. Devido a algumas dificuldades técnicas, nomeadamente o facto de que nem sempre existem teares adequados para produzir tecidos com baixa densidade de fios por cm², uma alternativa possível é a produção de um tecido a partir de fios de PES com uma outra fibra, que é posteriormente eliminada por tratamentos químicos. Nas misturas de fibras de PES com fibras celulósicas, a parte celulósica pode ser eliminada com ácido sulfúrico a 75 % (v/v).

A degradação biológica da celulose é feita por microorganismos celulolíticos, fungos e bactérias aeróbios e anaeróbios, que produzem enzimas celulolíticas. O tratamento enzimático dos materiais têxteis constitui uma alternativa mais ecológica aos processos químicos tradicionais.

A maioria dos estudos relativos ao tratamento enzimático dos tecidos, são desenvolvidos no sentido de otimizar as condições de tratamento para que se obtenham perdas de peso e resistência baixas. Neste trabalho tentou-se otimizar as condições de tratamento para que se obtenha uma perda de peso máxima.

No presente trabalho estudou-se a acção de uma celulase total comercial sobre um tecido de poliéster/algodão, com o objectivo de remover toda a celulose da mistura para que se obtenha um tecido de poliéster de baixo peso.

II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica apresentada incide sobre os aspectos fundamentais do poliéster, algodão e celuloses, de modo a facilitar o entendimento deste estudo.

1- O Poliéster

O Poliéster (PES) é uma fibra têxtil de grande importância comercial e é obtida a partir do poli (etileno tereftalato) (PET).

As fibras de poliéster são muito utilizadas em vestuário, têxtil lar e aplicações industriais. No caso do vestuário, é muito usado em misturas com outras fibras, principalmente o algodão mas também a viscose e lã.

1.1- Síntese do Poliéster

O polietileno tereftalato resulta da condensação entre o ácido tereftálico e o etilenoglicol, a uma temperatura de 280 °C. O álcool metílico formado é destilado e o éster diglicólico é pré - condensado no decurso desta operação (Araújo e Castro, 1986).

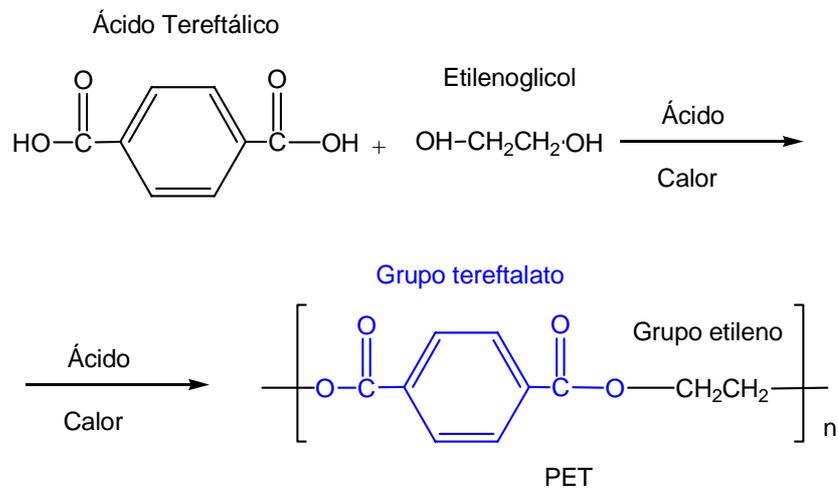


Figura 1: Reacção de condensação do PET (Guillen, 1991).

O polímero é extrudido por fusão (260 °C) e depois da extrusão, os filamentos sofrem um estiramento para orientar as macromoléculas segundo o eixo da fibra. É durante o processo de estiragem que se obtém a cristalinidade do poliéster.

As cadeias moleculares do poliéster são bastante rígidas como consequência da presença dos grupos ésteres do poli (etileno tereftalato) que garantem à fibra um elevado grau de cristalinidade.

1.2- Estrutura e Morfologia

As fibras de poliéster são de natureza cristalina e, a cristalinidade produz-se durante o processo de estiramento. Os diferentes estados da fibra apresentam as seguintes combinações de cristalinidade e orientação.

Tabela 1: Modelo estrutural que as fibras de PES apresentam nos diferentes estados (Guillen, 1991)

Estado da fibra	Modelo estrutural
Fibra depois da extrusão	Amorfo - Desorientado
Fibra depois de estiramento a frio	Amorfo - Orientado
Fibra extrudida e tratada termicamente	Cristalino - Desorientado
Fibra estirada a quente	Cristalino - Orientado

A cristalinidade de um polímero nunca é completa e a sua densidade varia com o grau de perfeição dos cristais. As cadeias moleculares estão ligeiramente inclinadas em relação ao eixo da fibra. Os segmentos alifáticos (-CH₂-CH₂-) adoptam uma configuração *trans* e o agrupamento das cadeias é bastante apertado de modo que não há muito espaço livre.

O agrupamento relativo das cadeias em cristal é tal que os anéis aromáticos estão dispostos perpendicularmente ao eixo da fibra.

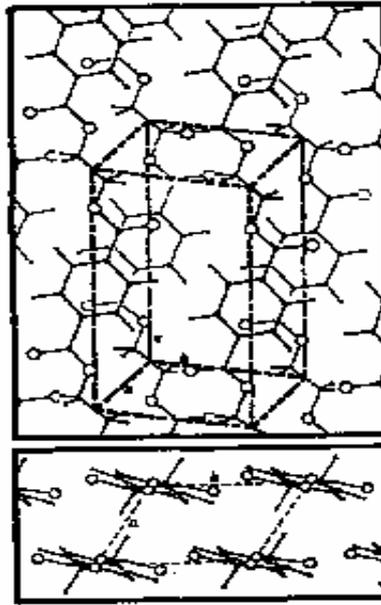


Figura 2: Estrutura do poli (etileno tereftalato) cristalino (Guillen, 1991).

As forças de atracção entre os átomos e moléculas vizinhas são da ordem de grandeza das forças de Van der Waals, não havendo evidência estrutural da existência de forças de atracção fortes entre moléculas. Assim, o elevado ponto de fusão da fibra não deve ser atribuído a forças de atracção fortes entre as moléculas, mas sim à rigidez do anel aromático e às ligações éster (Guillen, 1991).

As fibras convencionais utilizadas na indústria têxtil apresentam uma estrutura cristalina - orientada, com uma grande proporção de regiões de ordem intermédia. De acordo com o modelo clássico, as regiões intermédias situam-se entre as regiões cristalinas e amorfas (estrutura bifásica).

As regiões de ordem intermédia situam-se nos espaços interfibrilares das fibrilas formadas por regiões cristalinas e amorfas desordenadas (estrutura trifásica). De um modo geral, pode dizer-se que as regiões cristalinas estão divididas em duas partes que diferem na orientação. Podem distinguir-se como fracções cristalinas anisotrópicas (orientadas) e isotrópicas (desorientadas) (Guillen, 1991).

1.3- Propriedades Físicas

As fibras de poliéster têm uma densidade de 1.38 g/cm^3 e a sua secção transversal são reduzidas. A tenacidade varia entre 23 - 80 cN/tex, o alongamento à ruptura varia entre 8 - 50% e a resistência à ruptura varia entre 250 - 1200 cN/tex. Estes valores dependem do estiramento e da temperatura de estabilização (orientação e cristalinidade). A amplitude destes intervalos é grande como consequência das grandes possibilidades que o polímero oferece para preparar fibras com propriedades muito diferentes.

As fibras de poliéster são pouco elásticas, a sua recuperação ao alongamento é menor quando comparada com a poliamida. No entanto, a recuperação à deformação por flexão é excelente devido à rigidez intrínseca destas fibras. Daqui resulta a alta resistência à formação de rugas nos artigos de PES (Guillen, 1991).

O poliéster tem uma temperatura de fusão de $260 \text{ }^\circ\text{C}$. Ao aquecer o polímero observa-se uma transição vítrea a $67 \text{ }^\circ\text{C}$ e acima dos $100 \text{ }^\circ\text{C}$ a cristalização.

1.4- Propriedades Químicas

As fibras de poliéster são altamente hidrófobas. A retenção da água varia entre 2 - 5%. O poliéster apresenta uma excelente resistência aos ácidos inorgânicos (H_2SO_4 , HCl , HNO_3 , H_3PO_4) em concentrações diluídas. A acção dos ácidos na fibra depende da concentração, temperatura e tempo de actuação. Esta acção pode traduzir-se na perda de resistência da fibra ou na sua dissolução (concentrações de $\text{H}_2\text{SO}_4 > 83\%$).

Verifica-se que o ataque produzido pelo ácido clorídrico é mais intenso que o produzido pelo ácido sulfúrico. Isto é atribuído às diferenças de velocidade de difusão no interior da fibra. Devido ao seu volume molecular, a acção do ácido sulfúrico localiza-se à superfície da fibra pelo que, antes que haja a difusão para o interior da fibra, produz-se a hidrólise do polímero a ácido

tereftálico. Por este motivo, um tecido muito atacado pelo H_2SO_4 conserva uma excelente flexibilidade.

Estas fibras incham e dissolvem-se em fenóis, ácido cloroacético e alguns hidrocarbonetos clorados a altas temperaturas.

Devido ao carácter hidrófobo, à elevada cristalinidade, à orientação relativamente elevada das regiões desordenadas, as fibras de PES são difíceis de tingir. O tingimento é feito a altas temperaturas (120 - 130 °C) ou a 100 °C na presença de “carriers”.

Devido ao elevado grau de orientação, as fibras de PES possuem uma adequada resistência às bases, especialmente às que são utilizadas na lavagem. As bases fortes atacam a superfície da fibra e as bases fracas penetram no interior da fibra, modificando as suas propriedades físicas.

A velocidade da hidrólise superficial depende da concentração de base e da temperatura. Se estas variáveis forem adequadamente combinadas, podem conseguir-se efeitos de acabamento positivos pois a eliminação da camada superficial produz uma superfície ligeiramente ondulada, que confere aos artigos um toque mais suave.

2- O Algodão

2.1 - Estrutura morfológica

O algodão é a fibra celulósica mais importante e também a mais utilizada de todas as fibras têxteis actuais.

O algodão é uma fibra natural de origem vegetal. As fibras de algodão constituem o revestimento piloso do fruto do algodoeiro (*Gossypium*).

Existem diferentes variedades de algodão que dependem da sua origem geográfica e do seu grau de maturidade.

A composição aproximada do algodão é a seguinte (Araújo e Castro, 1986):

Celulose	85.5%
Óleos e ceras	0.5%
Proteína, pectoses e matéria corante	5%
Minerais	1%
Água	8%

As fibras de algodão têm uma estrutura monocelular que se diferencia a partir das células epidérmicas da semente do algodoeiro. O seu comprimento pode variar entre 9 e 60 mm e a sua espessura entre 12 e 20 μm .

Quanto à forma, apresenta longitudinalmente um número de “convulsões” variável que, em média, não se afasta muito de 5 por milímetro de fibra. Transversalmente, a forma típica de feijão torna-o facilmente identificável ao microscópio.

Do ponto de vista estrutural as fibras de algodão podem ser diferenciadas em: cutícula, camada primária, camada secundária e lúmen como está representado na figura 3.

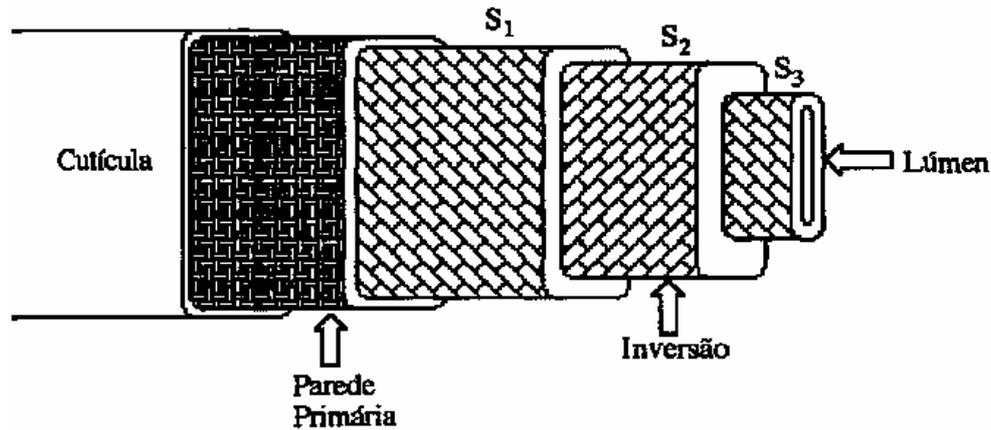


Figura 3: Estrutura morfológica da fibra de algodão (Cavaco-Paulo, 1995).

A cutícula é a parte mais externa da fibra, não celulósica. É constituída por ceras, gorduras, proteínas e pectinas, sendo por isso responsável pelas propriedades hidrófobas das fibras de algodão no seu estado natural. Antes do algodão poder ser usado como fibra têxtil é necessário remover a cutícula para assegurar a absorção das soluções de corante e dos outros reagentes durante os processos têxteis (Guillen et al., 1987).

A parede primária é constituída por celulose (>50%) mas contém também ceras, proteínas e pectinas. Esta parede está coberta pelos componentes da cutícula. As fibrilas exteriores desta camada estão paralelas ao eixo da fibra e formam com as interiores uma rede aproximadamente ortogonal (Guillen et al., 1987).

A parede secundária, mais espessa e cristalina de todas, é maioritariamente celulósica. É constituída por uma camada exterior denominada S_1 e por uma interior denominada S_2 . Na camada S_1 as fibrilas estão dispostas em espiral em redor da fibra, formando com o seu eixo um ângulo de $20 - 35^\circ$. O mesmo acontece na camada S_2 com a diferença que os feixes de fibrilas têm inversões no sentido do enrolamento, podendo formar um ângulo de $20 - 30^\circ$ (Cavaco-Paulo, 1995). A camada S_2 constitui cerca de 95% do peso da fibra, tem alta cristalinidade e é responsável pela resistência mecânica das fibras.

A parede do lúmen só se observa em fibras de algodão muito maduras e a disposição dos feixes de fibrilas é semelhante à camada S_1 (Cavaco-Paulo, 1995).

O lúmen é a parte mais interna da fibra, apresentando-se sob a forma de um canal central. É o que resta da célula inicial que originou a fibra e, por isso, contém restos de protoplasma, sais minerais e corantes responsáveis pela cor creme do algodão cru (Guillen et al., 1987).

2.2- Estrutura molecular

A celulose é um polímero linear formado por resíduos de glucose unidos por ligações β -1,4 (figura 4). Cada resíduo de glucose apresenta uma rotação de 180° em relação aos resíduos vizinhos, pelo que a unidade básica repetitiva é a celobiose.

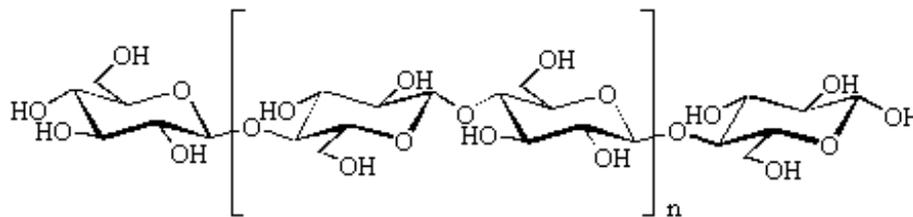


Figura 4: Fórmula estrutural da celulose (Gama, 1996).

O comprimento da cadeia varia entre 100 a 14000 resíduos conforme a origem da celulose. Apesar das duas extremidades da cadeia serem grupos hidróxilo, o grupo $C_1 - OH$ terminal é um grupo aldeído hidratado, derivado da formação do anel piranose por ligação intramolecular hemiacetal. Este grupo tem poder redutor, ao contrário do grupo alcoólico $C_4 - OH$ terminal.

Apesar da sua simplicidade química, a diversidade de origem e de processamentos tecnológicos subsequentes a que a biomassa celulósica é sujeita, conduz a uma complexa gama de formas físicas de celulose. A descrição destes substratos inclui propriedades como o tamanho, a forma, a porosidade, o grau

de polimerização, a área superficial, a associação com compostos não celulósicos, a conformação molecular e cristalinidade, todos eles relevantes para o processo de hidrólise (Beguin e Aubert, 1994).

As estruturas da celulose podem ser definidas em termos de três níveis organizacionais (Atalla, 1993). O primeiro é definido pela sequência de ligações covalentes, correspondendo a um homopolímero de anidrogucose com ligações β -1,4. O segundo nível descreve a conformação molecular, isto é, a organização espacial das unidades repetitivas, e é caracterizado pelas distâncias das ligações e respectivos ângulos, e pelas ligações de hidrogénio intramoleculares. O terceiro nível define a associação das moléculas formando agregados com uma determinada estrutura cristalina.

A celulose nativa ocorre na forma da celulose I, um dos tipos de malha cristalina possível, na qual as cadeias de celulose estão organizadas numa orientação paralela ao eixo da microfibrila. A celulose II é produzida por tratamento alcalino (mercerização) da celulose I, e diferencia-se desta por ter as cadeias numa orientação anti - paralela.

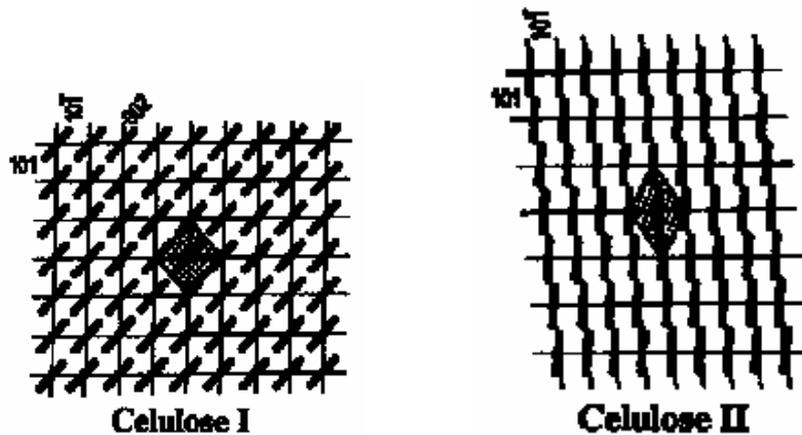


Figura 5: Estrutura cristalina da Celulose I e II (Gama, 1996).

A conversão de celulose I em II, com inversão da polaridade das moléculas, tem lugar em fase sólida, de modo não totalmente compreendido. Admite-se que as microfibrilas da celulose I adjacentes na estrutura fibrilar apresentam estatisticamente uma disposição anti - paralela e, na presença de NaOH, há cruzamento de moléculas intermicrofibrilas, de modo que a conversão teria lugar sem desagregação da estrutura das fibras (Gama, 1996).

Muitos estudos sobre a hidrólise enzimática consideram simplesmente a existência da celulose nativa em duas formas extremas: amorfa e cristalina. Estudos de microdifratometria, espectroscopia Raman e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C indicam que a celulose I é constituída por dois tipos de malha cristalina. As duas formas ocorrem em proporções características em celulosas de diferentes origens, e o ataque enzimático pode ser preferencial num dos tipos de estrutura.

A natureza das zonas amorfas da celulose é de difícil definição em termos estruturais. De forma geral, é considerada uma estrutura mais desorganizada com um arranjo irregular dos resíduos glicosil, pelo que, o índice de cristalinidade, determinado por difracção de raios - X ou RMN, é essencialmente uma propriedade relativa. Foram apresentados vários modelos esquematizando o carácter cristalino/amorfo das microfibrilas (Gama, 1996).

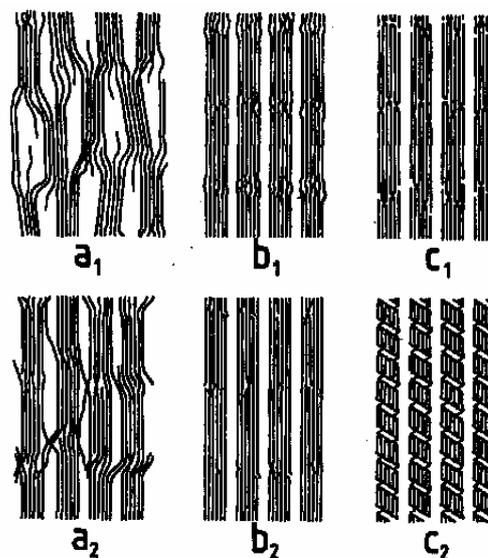


Figura 6: Modelos estruturais propostos para as fibrilas (Gama, 1996).

3- As Celulases

3.1- Degradação enzimática da celulose

Na natureza, a degradação da celulose é levada a cabo por fungos e bactérias. Estes produzem enzimas, celulases, que degradam especificamente a cadeia polimérica, originando polímeros com cadeias mais curtas.

As espécies de fungos mais estudadas que produzem celulases são o *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum* e *Humicola insolens*. Entre as bactérias, a *Cellulomonas fimi* e *Clostridium thermocellum*.

Os sistemas celulolíticos dos fungos e de algumas bactérias são constituídos por enzimas que actuam nas extremidades (exoglucanases) ou que actuam no meio (endoglucanases) das cadeias de celulose (Wood, 1992).

3.2- Sistema celulolítico produzido pelo *Trichoderma reesei*

Trichoderma reesei é o fungo celulolítico melhor caracterizado e o mais utilizado industrialmente para a produção de celulases (Beguin e Aubert, 1994; Kubicek e Harnden, 1999; Srisodsuk, 1994).

Produz um sistema completo de glucanases, o *T. Reesei* segrega pelo menos seis tipos de endoglucanases (EGI, EGII, EGIII, EGIV, EGV e EGV), duas celobiohidrolases (CBHI e CBHII) e duas β - glucosidase (celobiase) (Saloheimo et al., 1997; Saloheimo et al., 2002; Srisodsuk, 1994).

Tabela 2: Propriedades e organização estrutural das celulasas produzidas pelo *T. Reesei* (Saloheimo et al., 1997; Srisodsuk, 1994).

Enzima	Família	Aminoácidos	Massa Molecular Kda	Ponto Isoelétrico (pI)	Organização estrutural
EG I	7	437	50 - 55	4.6	 368 33 36
EG II	5	397	48	5.5	 36 34 327
EG III	12	218	25	7.4	 218
EG IV	61	326	(37) ^a	--	 233 56 37
EG V	45	225	(23) ^a	2.8 - 3	 166 23 36
EG VI	*	*	95 - 105	5.6 - 6.8	*
CBH I	7	497	59 - 68	3.5 - 4.2	 430 31 36
CBH II	6	447	50 - 58	5.1 - 6.3	 36 44 365

a - Massa molecular calculada a partir da sequência de Aminoácidos;

* - Gene não é descrito;

 - Domínio catalítico

 - Linker

 - CBD

A maioria das celulasas dos fungos, e todas as produzidas pelo *T. Reesei* são constituídas por dois domínios, funcionais e estruturalmente distintos.

O domínio catalítico que constitui a maior parte da proteína e um domínio responsável pela ligação da enzima ao substrato designado por “Core Binding Domain” (CBD). Os dois domínios estão ligados por uma sequência altamente glicosídica (“linker”). Das celulasas identificadas apenas EGIII não possui CBD e o “linker”. (tabela 2)

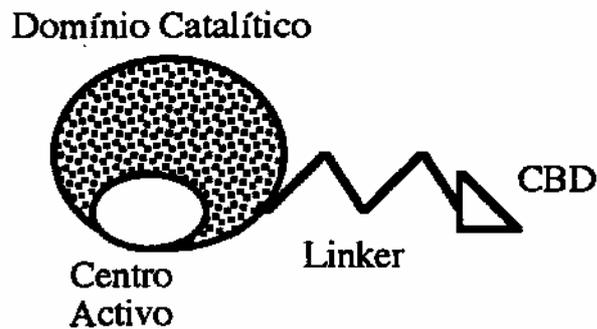


Figura 7: Representação esquemática de uma celulase (Cavaco-Paulo, 1995).

O primeiro domínio catalítico a ser resolvido foi o da CBHIII (Rouvinen et al., 1990). O sítio activo é constituído por um túnel com 20 Å de comprimento, contendo pelo menos quatro subsítios putativos (A - D) de ligação à cadeia de celulose. A catálise tem lugar entre os subsítios B e C por inversão da configuração anomérica. Pensa-se que a forma do túnel do sítio activo limita o ataque enzimático às extremidades não redutoras.

O domínio catalítico da CBHI (Kraulis et al., 1989) é formado por um túnel que se prolonga 40 Å no interior da proteína e acomoda uma única cadeia de polímero de glucose. Compreende sete subsítios (A - G) dos quais quatro contêm resíduos de triptofano, que se admite serem importantes no processo de ligação do domínio catalítico ao substrato. Ao contrário da CBHIII, a CBHI ataca a celulose a partir da extremidade redutora adicionando um substrato solúvel ao cristal de enzima, que pode ser visto ao sítio activo com o cromóforo junto ao subsítio A.

O mecanismo de reacção catalisada pelas glucosidades, incluindo as celulasas, é um mecanismo de reacção ácido - base. Dois resíduos no centro activo estão envolvidos na reacção. Um actua como catalisador ácido, promovendo a protonação do átomo de oxigénio da ligação glicosídica.

Conforme o modo de acção do segundo resíduo, a reacção resulta na retenção da configuração do carbono anomérico, ou na sua inversão. O segundo resíduo actua como nucleófilo, podendo interagir electrostaticamente com o oxocarbanião intermediário, no caso das enzimas com retenção da configuração, ou promovendo a formação de um grupo hidróxilo a partir de uma molécula de água, nos casos em que se dá inversão da configuração anomérica (Sinnot, 1990).

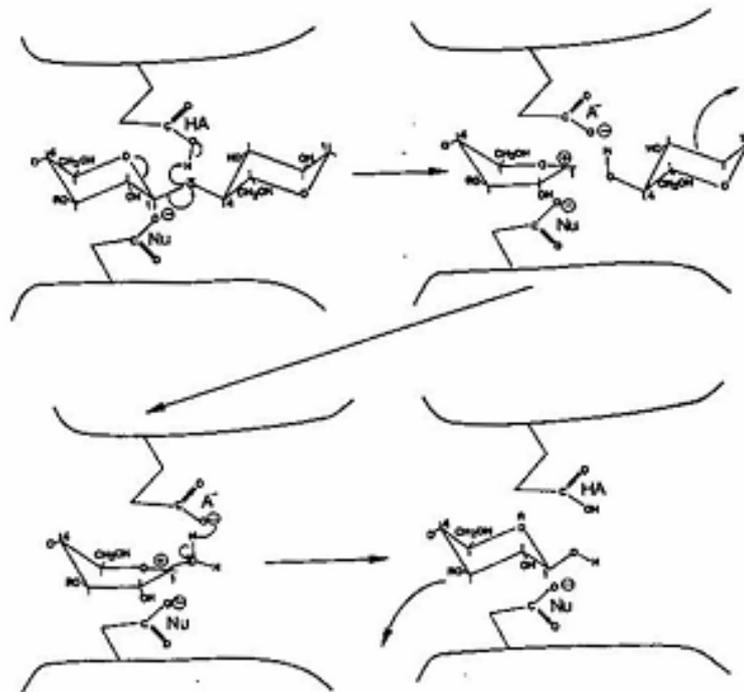


Figura 8: Reacção no centro catalítico das celulasas segundo o mecanismo de deslocamento em duas fases (S_N1) em que a configuração é mantida (Reinikainen, 1994).

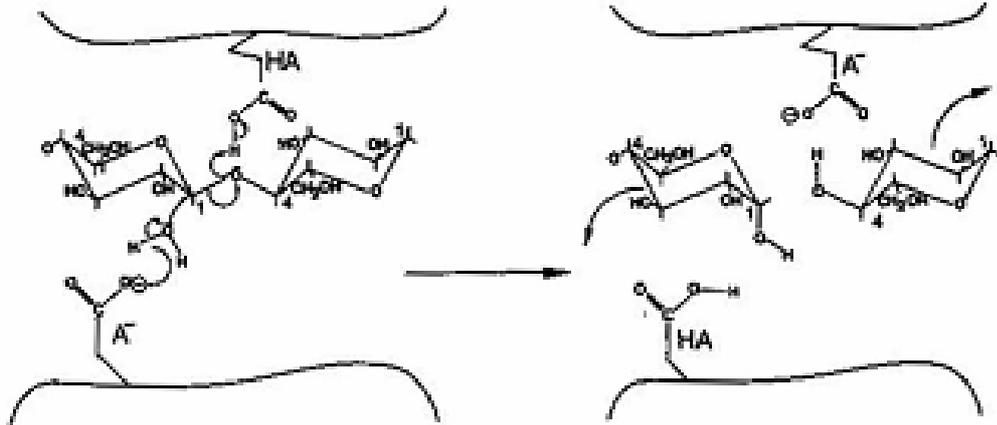


Figura 9: Reacção no centro catalítico das celulasas segundo o mecanismo de deslocamento simples (S_N2) com inversão da configuração (Reinikainen, 1994).

3.3- Medição da actividade enzimática

A caracterização de misturas ou celulasas individuais levanta dificuldades que estão relacionadas com a natureza multicomponente das enzimas e da sua diferente eficácia em diferentes substratos celulósicos.

Tem sido utilizada uma grande variedade de celulosas nativas e modificadas na caracterização das celulasas, e diferentes ensaios têm sido desenvolvidos e usados para demonstrar a acção específica das mesmas.

Tabela 3: Métodos usados na medição da actividade das celulasas (Bhat e Bhat, 1997; Enari e Markkanen, 1997; Reinikainen, 1994; Teeri, 1997)

Enzima	Substrato	Ensaio
Celulase Total (TC)	- Algodão - Papel de filtro (PF), Avicel ^a , Solka Floc ^b e BMCC ^c - Celulose amorfa - Celuloses tingidas	- Solubilização: perda de peso e de resistência; Açúcares redutores libertados; Estimativa do resíduo de celulose; Poder redutor do algodão; - Açúcares redutores libertados; Determinação do DP; - Diminuição da turbidez; - Libertação de fragmentos solúveis tingidos;
Celobiohidrolases (CBHs)	- Substratos celulósicos anteriores - Celooligosacarídeos substituídos (com marcadores cromóforos, fluorogénicos ou radioactivos) e não substituídos	- Ensaio anteriores; - Análise dos açúcares por HPLC; libertação do cromóforo; aumento do poder redutor;
Endoglucanases (Egs)	- Substratos celulósicos anteriores - CMC ^d - HEC ^e	- Ensaio anteriores; - Libertação de açúcares redutores; - Diminuição da viscosidade;
β - glucosidase ou celobiase	- Celobiose - <i>o</i> - ou <i>p</i> - nitrofenil- β - D-glucoside - Celooligosacarídeos	- Libertação de glucose; - Libertação de <i>o</i> - ou <i>p</i> - nitrofenol; - Aumento do poder redutor;

^a Avicel é uma celulose microcristalina comercial;

^b Solka Floc é composta por celuloses cristalinas e amorfas. É relativamente pura, contém pelo menos 99.5% de celulose;

^c Celulose microcristalina bacteriana;

^d Carboximetilcelulose;

^e Hidroxietilcelulose;

3.4- Modo de acção das celulases: Sinergismo

Apesar das reservas apresentadas por alguns autores, relacionadas com a especificidade das diferentes celulases e o seu modo de acção, é geralmente reconhecida a existência de três tipos de celulases nos sistemas completos: exoglucanases ou celobiohidrolases, endoglucanases e β - glucosidase ou celobiase.

As endoglucanases hidrolizam maioritariamente as ligações internas no polímero da celulose, produzindo novas cadeias terminais, logo causam uma diminuição considerável no DP da celulose (Heikinheimo, 2002; Wood, 1989).

As exoglucanases iniciam a hidrólise nas extremidades da cadeia, e não produzem uma quantidade significativa de novas cadeias terminais na superfície da celulose (Heikinheimo, 2002; Irwin et al., 1993). CBHI e CBHII quebram as unidades de celobiose das extremidades reductora e não reductora do polímero, respectivamente (Heikinheimo, 2002; Vrsanská e Biely, 1993).

As celobiohidrolases também podem actuar nas regiões cristalinas da celulose sem a ajuda das endoglucanases (Chanzy e Henrissat, 1985; Heikinheimo, 2002). As β - glucosidases completam a hidrólise catalisando a hidrólise da celobiose a glucose.

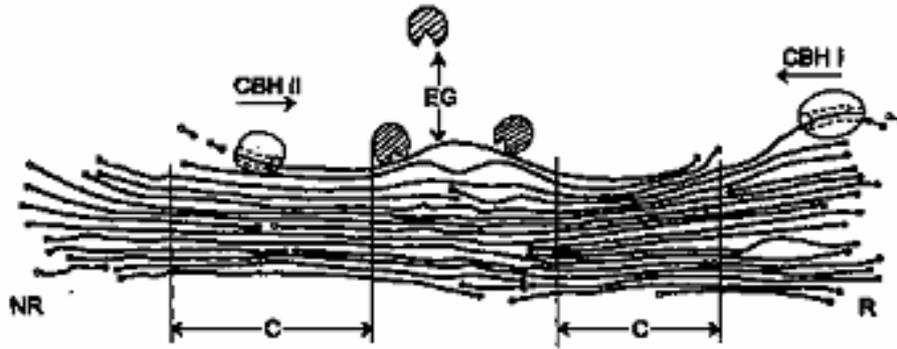


Figura 10: Representação esquemática da hidrólise da celulose (Heikinheimo, 2002; Teeri, 1997).

C define as regiões cristalinas; R representa os grupos terminais reductores; NR representa os grupos terminais não - reductores.

A hidrólise da celulose cristalina pelas celulasas requer a acção sinérgica das endoglucanases e das celobiohidrolases. O máximo sinergismo é obtido com uma elevada quantidade de exoglucanases na mistura (Reinikainen, 1994). Sabe-se também que o grau de sinergismo depende do substrato usado (Nidetzky et al., 1993).

3.5- Aplicações biotecnológicas das celulasas na Indústria Têxtil

A celulose é um polímero que existe em grande abundância na natureza. É o recurso natural renovável produzido em maior quantidade, e a partir dele são produzidos inúmeros bens de consumo.

A principal fibra utilizada na Indústria Têxtil é o algodão, constituído por celulose pelo que, as oportunidades de aplicação das celulasas nesta indústria são numerosas.

As enzimas têm sido usadas na indústria têxtil há décadas. A descolagem com amilases foi a primeira aplicação enzimática (Cavaco-Paulo, 1998b). Com o desenvolvimento da aplicação das celulases no tratamento dos artigos denim ou outros artigos de algodão, a indústria têxtil tornou-se numa área fundamental para os produtores de enzimas. Hoje, aproximadamente 80% dos artigos denim são tratados com celulases, e cerca de 10% de outros acabamentos do algodão usam celulases.

A maioria dos tratamentos enzimáticos aplicados às fibras celulósicas tem como finalidade a obtenção de novos efeitos de acabamento, ou a substituição de produtos químicos usados nos processos tradicionais.

3.5.1- “Biopreparação”

A fervura alcalina e o branqueio do algodão envolvem o uso de elevadas concentrações de alcali, peróxido de hidrogénio e outros químicos, combinados com elevadas temperaturas para assegurar a eficiente remoção das impurezas antes do tingimento. Estes processos podem causar a despolimerização da celulose e perdas significativas de peso e resistência dos artigos (Buschle-Diller et al., 1994; Li e Hardin, 1998).

Tem sido demonstrado que as impurezas do algodão podem ser removidas por enzimas específicas. O uso de celulases aumenta a hidrofiliabilidade do algodão (Hartzell e Hsieh, 1998), e o tratamento com celulases aplicado antes da fervura alcalina é eficiente na remoção das cascas do algodão descolado (Csiszár et al., 1998).

3.5.2- “Processos de envelhecimento”

As celulases são usadas no acabamento dos artigos denim substituindo o processo de remoção parcial do corante Indigo, conhecido por “Stone Washing”. Este processo envolve a adição de 1 - 2 Kg de pedras-pomes por par de calças no processo a molhado, o que causa graves problemas a nível do processo e equipamento.

As celulases têm sido usadas na lavagem denim desde 1980 (Kochavi et al., 1990; Tyndall, 1992). A preparação enzimática é adicionada aos artigos denim descolados numa máquina de lavar; e a combinação entre a acção da enzima, a fricção entre os artigos bem como a abrasão provocada pela máquina, provoca o efeito de “envelhecimento” e amaciamento dos artigos.

Foi proposto um modelo empírico da descoloração dos artigos de algodão. Conclui-se que a acção mecânica “abre” as camadas mais externas do cristal celulósico, aumentando desta forma a acessibilidade da enzima à celulose, o que permite a remoção enzimática do corante (Zeyer et al., 1994).

No processo enzimático não é necessário remover partículas das pedras dos artigos, além disso, a capacidade das máquinas é melhorada devido à diminuição dos tempos de processo (Kochavi et al., 1990).

Durante o tratamento com celulases dos artigos de ganga, o corante removido pode redepositar ou manchar o reverso ou a frente dos artigos, diminuindo o efeito desejado. Foram realizados vários estudos para otimizar o processo de lavagem denim para se obter um manchamento mínimo (Cavaco-Paulo et al., 1998a; Ehret, 1994; Klahorst et al., 1992; Kochavi et al., 1990).

3.5.3- "Biofinishing"

"Biofinishing" ou "biopolishing" é o termo usado para descrever a remoção das fibrilas ou microfibrilas do algodão usando celulases.

A presença de fibrilas origina problemas nos artigos relacionados com a formação de borboto ("pilling") e um aspecto desbotado devido a uma aparente perda de cor. A remoção enzimática das fibrilas resulta em artigos mais macios e "limpos", o que retém a cor original (Asferg e Videbaek, 1990; Tyndall, 1990), e também previne a formação de borboto durante o uso e as lavagens.

Outros benefícios deste tipo de acabamento incluem melhor "drapé", efeitos "wash - down" e melhoramento na absorção de humidade, este último com especial vantagem para os têxteis - lar (Clarkson et al., 1992).

Uma grande vantagem dos processos enzimáticos é que estes podem ser aplicados no equipamento já existente. As celulases são normalmente aplicadas como um sistema enzimático multicomponente, e a maioria das celulases comerciais contém diferentes actividades (Nidetzky et al., 1993).

Os produtores de enzimas recomendam dosagens de aproximadamente 0.05 - 6% de enzima por massa de artigo, dependendo do efeito desejado, do processo e da actividade da enzima (Miettinen-Oinonen et al., 1997a).

O intenso contacto mecânico gerado pelas máquinas resulta na quebra das extremidades das fibras, enfraquecidas pela enzima. Devido a composições de enzima não - optimizadas e às elevadas dosagens, podem ocorrer perdas de peso e de resistência significativas.

Um processo de "biopolishing" eficaz, sem provocar perdas de peso e de resistência excessivas, é geralmente obtido com 3 - 5% de perda de peso do artigo (Lund e Pedersen, 1994).

Foram desenvolvidos vários estudos para minimizar os aspectos negativos do "biopolishing", perda de peso e de resistência, e para melhor compreender o mecanismo de hidrólise do algodão.

Quando comparados os efeitos de uma celulase ácida total comercial, uma celulase ácida multicomponente endo - enriquecida e uma endoglucanase ácida monocomponente num tecido de algodão interlock, verifica-se que diferentes celulases têm diferentes selectividades. A sensibilidade à relação de banho e à agitação mecânica também difere significativamente (Lin e Hsieh, 2001). Para se obter um acabamento enzimático óptimo é importante seleccionar uma enzima baseada na sua selectividade, o equipamento existente e o tipo de fibra.

Além da perda de peso e de resistência dos artigos, a formação de poeiras também pode provocar problemas (Pere et al., 2001). O fino pó de algodão formado no processo de acabamento pode causar problemas aos operários se não for devidamente removido. A repetida inalação de poeiras que contêm enzima pode causar alergias respiratórias (Vanhanen et al., 2000; Yingling, 2000).

O tratamento enzimático com celulases melhora a estabilidade dimensional dos artigos de algodão. Após o tratamento, em pad-batch, com baixos níveis de celulase endo - enriquecida, e dos testes de lavagem normalizados, a estabilidade dimensional dos artigos de algodão melhora, sem perdas de peso e de resistência elevadas (Cortez et al., 2002).

A razão para o melhoramento da estabilidade dimensional não está completamente compreendida, mas sugeriu-se que a hidrólise parcial dos tecidos que não estão sujeitos ao stress mecânico durante o processo, pode resultar no relaxamento das fibras (Cortez et al., 2002).

Por outro lado, foi sugerido que as mudanças nas cadeias externas quebradas diminuem o colapso das fibras durante a secagem, melhorando a estabilidade dimensional (Cavaco-Paulo, 2001).

O processo de “biopolishing” também é usado no tratamento do lyocell. A fibra celulósica de lyocell é preparada a partir da polpa de madeira num sistema de solvente de amina. A estrutura altamente cristalina destas fibras é a base para a fibrilação. A fibrilação ocorre quando a fibra é sujeita a acção mecânica no estado molhado, e é muito usada na criação de tecidos “pele de pêssego” (Kumar e Harden, 1999; Taylor, 1998). Este processo requer três etapas: uma fibrilação primária a uma temperatura acima de 90 °C com a adição de soda para provocar o inchamento da fibra; o tratamento com celulase para “limpar” a superfície do tecido; por fim uma fibrilação secundária com elevada acção mecânica. A remoção das microfibrilas, bem como a sua formação, pode ser induzida com celulases (Kumar e Harden, 1999; Morgado et al., 2000).

3.6- Modo de acção das celulases no algodão

Existem diferentes parâmetros que influenciam a habilidade das celulases actuarem na celulose do algodão, como por exemplo: sinergismo das celulases, tratamento prévio do algodão, condições de tratamento e máquinas.

As condições óptimas de tratamento com celulases comerciais de *T. Reesei* são 50 °C e pH 5. A actividade enzimática diminui rapidamente acima de 65 °C de ambos os lados do pH óptimo. Para manter o pH óptimo durante todo o tratamento é necessário utilizar um sistema tampão apropriado.

A actividade das celulases no algodão é influenciada pela força iónica e espécies iónicas adsorvidas (Cavaco-Paulo et al., 1998c). A presença de iões metálicos na hidrólise da celulose diminui a actividade enzimática (Zeyer et al., 1994).

A adsorção das celulases no substrato celulósico é um pré - requisito para a hidrólise. As medidas de adsorção são normalmente baseadas na determinação da concentração de proteína livre na mistura de reacção, após a incubação da enzima com o substrato (Cavaco-Paulo et al., 1998a).

III PARTE EXPERIMENTAL: MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Materiais

1.1 - Reagentes

- Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$), Sigma;
- Ácido o - fosfórico (H_3O_4O), Riedel - de Haën;
- Etanol absoluto (C_2H_6O), Panreac;
- Hidróxido de sódio (NaOH), Sigma;
- Carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3), Sigma;
- Coomassie Brilliant Blue G 250 C.I. 42655 ($C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$), Merck;
- Cloreto de neocuproina hidratado ($C_{14}H_{12}N_2.HCL$), Sigma;
- Sulfato de cobre (II) pentahidratado, ($CuSO_4.5H_2O$), Sigma;
- D (+) - Glucose ($C_6H_{12}O_6$), Merck;
- Albumina Sérica de Bovina (BSA), Sigma;
- Carboximetilcelulose (CMC), sal de sódio de alta viscosidade, Sigma

1.2 - Enzimas

Tabela 4: Características e composição das celulasas, com origem no fungo *Trichoderma reesei*, usadas neste trabalho

Celulase	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Concentração de Proteína (mg/ml)	Fornecedor
Crude total (TC) CE 883042	4,5 - 5,5	45 - 50	20.5 ± 0.4	Röhm
EG-rich CE 523/92	4,5 - 5,5	45 - 50	8.2 ± 0.6	Röhm
CBH-rich CE 519/92	4,5 - 5,5	45 - 50	33.6 ± 0.3	Röhm
Celusoft L	4,5 - 5,5	45 - 50	14.6 ± 0.1	Aquitex

1.3- Substratos

O tecido de algodão usado neste trabalho foi um tecido mercerizado. Previamente aos tratamentos enzimáticos, as amostras foram lavadas com um sabão não - iónico, Lutensol, a 60 °C durante 30 minutos. O tecido de poliéster/algodão foi previamente lavado com carbonato de sódio e depois com Lutensol. Na tabela 5 estão indicadas as características dos tecidos utilizados.

Tabela 5: Características dos tecidos utilizados

	Algodão	Poliéster/Algodão
Composição	100% CO	66% CO 34% PES
Debuxo	Tafetá	Tafetá
N.º de fios/cm	30	25
N.º de passagens/cm	54	33
Peso específico (g/m²)	106.8 ± 0.9	127.6 ± 0.9

1.4 - Equipamentos

Os tratamentos enzimáticos foram realizados num aparelho simulador de lavagens Rotawash. Na medição do pH utilizou-se um medidor de pH modelo pH 526 Multical.

Na determinação da actividade enzimática, as amostras foram incubadas num banho de água termostaticado com agitação modelo Grant OSL 200.

As determinações colorimétricas foram efectuadas num espectrofotómetro de UV - Vis modelo Helios γ Unicam.

2 - Métodos

2.1 - Determinação dos Açúcares Redutores

A determinação dos açúcares redutores em solução foi feita de acordo com o método descrito por Cavaco-Paulo (Cavaco-Paulo, 1995).

2.1.1 - Descrição do método

Este método depende da redução do complexo de neocuproina - Cu (II) (solução amarela) a neocuproina - Cu (I) (solução laranja) quando aquecido com açúcares redutores em meio alcalino. A mudança de cor é monitorizada através da leitura da absorvância a 475 nm.

O reagente de Neocuproina - Cu é preparado através da dissolução de sulfato de cobre (II) pentahidratado (0.2 g) e cloreto de neocuproina (0.4 g) em 1000 ml de água destilada.

Misturam-se 0.05 ml de amostra, 2 ml de carbonato de sódio (2%) e 5 ml do reagente de Neocuproina - Cu num tubo de teste que é posteriormente incubado num banho de água a ferver durante 5 minutos. Depois de arrefecidos, adiciona-se 10 ml de água destilada a cada tubo. A absorvância a 475 nm foi medida contra um "branco" (0.05 ml de tampão, 2 ml de carbonato de sódio e 5 ml de reagente) num espectrofotómetro de UV-Vis. As determinações foram feitas em triplicado, e o valor final corresponde à média aritmética. O açúcar padrão usado para construir a curva de calibração foi a Glucose (1000 mg/L).

$$\text{Absorvância (475 nm)} = (0.162 \pm 0.005) + (0.00039 \pm 0.00001) \times [\text{Glucose}] \text{ (mg/L)}$$

$$r = 0.996$$

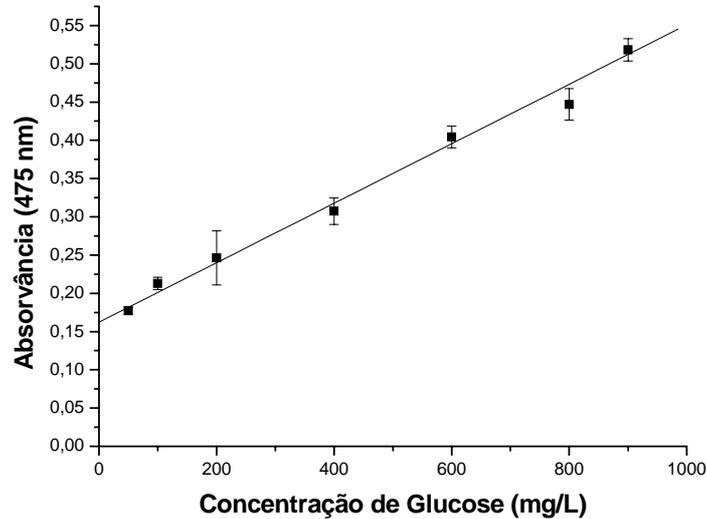


Figura 11: Curva de calibração para a medição dos açúcares redutores pelo método de Neocuproina - Cu, usando Glucose como açúcar padrão.

2.2 - Determinação da proteína em solução

A proteína total em solução foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

2.2.1 - Descrição do método

Este método baseia-se na mudança de cor da solução ácida de Coomassie Brilliant Blue G 250 para azul, quando está ligado a uma proteína. A ligação do corante à proteína desvia o máximo de absorção do corante de 465 nm (vermelho) para 595 nm (azul), desta forma o complexo proteína - corante pode ser medido espectrofotometricamente a 595 nm. Para a preparação do reagente de proteína dissolvem-se 100 mg de corante Coomassie em 50 ml de etanol (95%). Adiciona-se 100 ml de ácido *o* - fosfórico (85%) e dilui-se com água destilada para um volume final de 1000 ml.

A 0.1 ml de amostra adiciona-se 5 ml de reagente de proteína. Após agitação, mede-se a absorvância a 595 nm contra um “branco” (0.1 ml de tampão e 5 ml de reagente) num espectrofotómetro de UV - Vis. Cada determinação foi feita em triplicado e o valor final corresponde à média aritmética. A proteína padrão utilizada para construir a curva de calibração foi a Albumina Sérica de Bovino, BSA (500 mg/L).

$$\text{Absorvância (595 nm)} = (0.046 \pm 0.002) + (0.000889 \pm 0.000004) \times [\text{Proteína}] \text{ (mg/L)}$$

$$r = 0.997$$

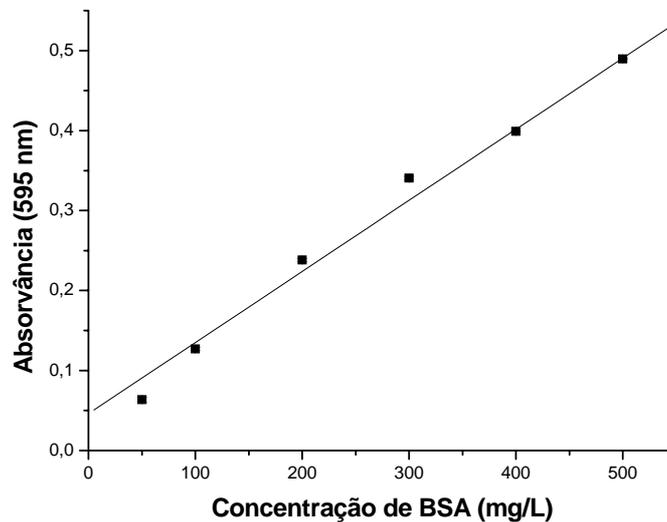


Figura 12: Curva de calibração para a medição da concentração de proteína pelo método de Bradford, usando BSA como proteína padrão.

2.3 - Determinação da Perda de Peso Total

A perda de peso foi determinada pela diferença na massa das amostras depois e antes dos tratamentos enzimáticos, e sempre após o condicionamento das amostras durante 24 horas a 20 °C e 65% de humidade relativa. Em cada experiência foi incluído um controlo que corresponde a uma amostra sujeita às mesmas condições e tratamentos mas sem celulases.

A perda de peso é calculada de acordo com a seguinte expressão:

$$\text{Perda de Peso (\%)} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100$$

m_i - massa inicial da amostra;

m_f - massa final da amostra após tratamento enzimático;

2.4 - Determinação da Perda de Peso Insolúvel

A perda de peso insolúvel (PPI) é normalmente determinada usando um oxidante forte, dicromato de potássio, que digere o material insolúvel produzido durante a hidrólise. Devido à grande quantidade de material insolúvel produzido neste trabalho, não se utilizou este método.

A perda de peso insolúvel foi determinada pela filtração do líquido final de tratamento. O filtrado foi lavado com água destilada para remover todos os açúcares redutores. Depois de seco, pesou-se e a perda de peso insolúvel foi determinada a partir da expressão:

$$PPI(\%) = \frac{m'}{m_i} \times 100$$

m' - massa do filtrado seco;

m_i - massa inicial da amostra;

2.5 - Actividade em carboximetilcelulose (CMC)

Mediu-se a actividade enzimática num substrato padrão, CMC, de acordo com o seguinte procedimento: 1 ml de solução de enzima é pré - incubado, num tubo de teste, num banho de água a 50 °C. Adiciona-se a mesma quantidade de solução de CMC (0.5%, dissolvida em tampão de acetato 0.1 M) ao tubo, e a incubação ocorre durante 30 minutos, num banho de água a 50 °C com agitação (80 rpm).

Os açúcares redutores libertados foram determinados pelo método descrito em 2.2.1, e a actividade foi expressa em termos de mg/L de açúcares redutores produzidos. Os ensaios foram feitos em triplicado.

2.6- Actividade no tecido de algodão

As amostras de algodão (0.5 g) foram tratadas com uma solução enzimática de concentração 1 mg/ml preparada em tampão de acetato (0.1 M, pH 5). A incubação foi feita no Rotawash (20 rpm) a 50 °C durante 60 minutos. A actividade no tecido de algodão é expressa em termos de perda de peso (%), determinada de acordo com o procedimento descrito em 2.3. Os ensaios foram feitos em duplicado.

2.7 - Tratamentos enzimáticos

A actividade enzimática nos tecidos foi medida por incubação da amostra com uma solução enzimática preparada em tampão apropriado, a 50 °C durante um período de tempo.

A dosagem enzimática, a relação de banho, o tempo de tratamento e grau de agitação são especificados para as experiências individuais (capítulo IV). A actividade da celulase foi expressa em termos de perda de peso total das amostras.

No final de cada tratamento, para remover a enzima, as amostras foram imersas numa solução de carbonato de sódio (5%) e enxaguadas com água destilada quente e fria. Os tecidos foram secos e pesados para a determinação da actividade.

Os ensaios foram efectuados em duplicado, e em todos os tratamentos, existe um controlo que corresponde a uma amostra tratada nas mesmas condições sem enzima, para controlar a variação das propriedades dos tecidos.

2.8- Determinação da Flexão dos tecidos

A flexão dos tecidos foi determinada de acordo com a norma inglesa BS 3356:1961 (Handbook 11:1974).

A norma descreve o método para a determinação do declive de flexão, C , e da flexão, G , dos tecidos, utilizando um flexómetro de ângulo fixo (41.5°).

O declive de flexão é um dos factores que determina a maneira como o tecido “caí”. Está relacionado com a rigidez do tecido, de forma que tecidos com elevado declive de flexão têm tendência a “cair” rigidamente.

A flexão é uma medida da resistência dos tecidos a dobrarem-se a forças externas. Tecidos com uma elevada flexão têm tendência a serem rígidos. A flexão é determinada pela expressão:

$$G = 0.10 \times M \times C^3$$

G - Flexão (mg.cm);

M - Massa por unidade de superfície (g/m^2);

C - Declive de flexão (cm);

2.9- Determinação da Força Máxima à Ruptura

A força máxima de ruptura e o alongamento à ruptura foram determinados de acordo com a norma NP EN ISO 13934 - 1: 2001.

Uma amostra de tecido de dimensões especificadas é traccionado a uma velocidade constante até à ruptura. A força máxima de ruptura e o alongamento à ruptura foram registados pelo dinamómetro.

Segundo a norma, a largura de cada provete deve ser de 50 mm \pm 0.5 mm, e o comprimento deve ser de 200 mm. Contudo, devidos às dimensões da amostra tratada, em vez de uma tira usaram-se fios da teia e trama. Foram efectuados 10 ensaios à teia e trama.

2.10- Análise Quantitativa de Misturas

A análise quantitativa da mistura de poliéster/algodão foi determinada de acordo com a norma NP 2248: 1998.

A amostra é tratada com uma solução de ácido sulfúrico a 75% (m/m), a 50 °C para que se elimine a celulose da mistura. A percentagem do componente insolúvel puro e seco é determinada pela expressão:

$$P(\%) = \frac{100 \cdot m_1 \cdot d}{m_0}$$

m_0 - massa do provete puro e seco;

m_1 - massa do resíduo seco;

d - factor de correcção para a perda de massa sofrida pelo componente insolúvel durante a análise ($d = 1.00$);

Este método foi também utilizado para a obtenção do “esqueleto”. Esta é uma amostra na qual foi removida toda a celulose, e que serve para comparação com as amostras tratadas enzimaticamente. O “esqueleto” foi feito em duplicado

2.11- Microscopia Electrónica de Varrimento (Scanning electronic microscopy - SEM)

As fotografias SEM das amostras, previamente metalizadas, foram obtidas no microscópio electrónico de varrimento modelo LEICA S360 com detector de electrões secundários e retrodifundidos.

2.12- Determinação do Coeficiente de Fricção

O coeficiente de fricção cinético, μ_{kin} , foi determinado pelo FRICTORQ (Lima et al., 2004). O princípio do FRICTORQ baseia-se no movimento rotativo de uma superfície padrão que fricciona a superfície lisa do tecido logo, é baseado na medição do binário de reacção.

A superfície padrão é constituída por duas superfícies cilíndricas em metal. A superfície inferior está em contacto com o tecido, e é constituída por três sensores colocados segundo um ângulo de 120°. A superfície superior é forçada a rodar segundo um eixo vertical a uma velocidade angular constante.

Os três sensores que estão em contacto com a superfície da amostra, originam um deslocamento relativo de aproximadamente 90°, assegurando que a superfície padrão está sempre em contacto com uma superfície nova de tecido (Lima et al., 2004). Os ensaios foram feitos em triplicado.

2.13- Tratamento estatístico dos dados

Para cada série de medições num ensaio, determinou-se:

- Média aritmética, \bar{X}

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

Cálculo do erro associado à média:

- Desvio padrão, σ

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

n - número de repetições;

x_i - valor da variável;

O resultado final pode ser representado por:

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

Onde t de Student se encontra tabelado (tabelas de Fisher) em função de n-1 graus de liberdade e do nível de confiança pretendido. Neste trabalho utilizou-se um nível de confiança de 95%.

Regressão Linear

Os coeficientes **a** e **b** da recta $Y = ax + b$ foram calculados a partir das fórmulas:

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

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

Determinação dos erros associados aos coeficientes **a** e **b**:

- Desvio padrão, σ

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

- Variância, σ^2

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

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

A equação da recta apresenta-se da seguinte forma:

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

em que o t de Student é referido para n-2 graus de liberdade para um nível de confiança de 95%.

IV APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

1 - Actividade enzimática

A actividade enzimática foi determinada em dois substratos diferentes, num derivado de celulose solúvel (CMC) e em celulose do algodão. A actividade em CMC é expressa em mg/ml de açúcares redutores produzidos, e a actividade no algodão é expressa em termos de perda de peso (%) das amostras.

Tabela 6: Actividades enzimáticas

Enzima /Substrato	CMC (mg/ml)	CMC ($\mu\text{mol}/\text{mim}$)	Algodão (%)
EG-rich CE 523/92	43.8 \pm 0.2	197.7 \pm 0.7	0.34 \pm 0.01
CBH-rich CE 519/92	30.6 \pm 0.2	33.7 \pm 0.2	0.55 \pm 0.03
TC CE 883042	36.9 \pm 0.3	66.7 \pm 0.5	0.92 \pm 0.02
Celusoft L	25.8 \pm 0.3	32.7 \pm 0.3	4.0 \pm 0.1

As celulasas EG-rich e CBH-rich são geneticamente modificadas. Na celulase EG-rich foi apagada a actividade de CBH I e CBH II do crude total, e na celulase CBH - rich apagou-se a actividade de EG I e EG II.

A celulase EG-rich possui uma maior actividade em CMC, o que confirma a sua actividade "endo". Ao contrário das CBHs, que possuem um centro activo em forma de "túnel", as EGs possuem um centro activo em forma de "fenda", pelo que actuam em celulasas ramificadas como a CMC. Por este motivo, se considera que a actividade em CMC é uma medida da actividade "endo" de uma enzima (Rouvinen et al., 1990). Contudo, uma maior actividade em CMC não corresponde a uma maior actividade no algodão. Verifica-se que esta enzima é a que possui uma menor actividade no algodão. Por sua vez, a

celulase Celusoft L possui a menor actividade em CMC mas a sua actividade no algodão é a maior. Assim, deve ter-se muito cuidado ao prever a actividade de uma enzima no algodão baseada nas actividades obtidas com outras formas de celulose.

De todas as celulasas estudadas, verifica-se que são as celulasas totais, TC e Celusoft L, que possuem maior actividade no algodão. Este facto vem confirmar a importância do sinergismo entre as Egs, CBHs e celobiase na hidrólise da celulose do algodão.

Verifica-se que a remoção das CBHs da mistura total reduz a perda de peso de 0.92 para 0.34%. Estes resultados confirmam a importância da actividade de CBH na solubilização do polímero, como aliás já tinha sido demonstrado (Cavaco-Paulo et al., 1998c).

Comparando as duas celulasas totais, verifica-se que a Celusoft L possui maior actividade no algodão, pelo que pode dizer-se que a enzima possui uma maior actividade “exo” que a enzima TC.

2- Tratamento do tecido 100% algodão

2.1 - Efeito da composição celulolítica

As amostras de algodão (0.5 g) foram tratadas com celulasas ácidas total (TC), endo - enriquecida (EG-rich) e exo - enriquecida (CBH-rich) do *T. Reesei*. Utilizaram-se dosagens enzimáticas de 0.0, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16 e 0.2 mg/g, preparadas através da dissolução da enzima em 100 ml de solução tampão de acetato (0.1 M, pH 5). Os tratamentos foram realizados durante 48 horas a 50 °C num banho de água com agitação orbital (80 rpm) e no Rotawash (20 rpm). Os tratamentos realizados no banho de água são tratamentos com baixo nível de agitação mecânica, enquanto que os realizados no Rotawash têm uma elevada agitação mecânica devido ao movimento que a amostra sofre no copo de tratamento. No final do tratamento as amostras foram removidas e tratadas como está descrito em 2.4 para a determinação da actividade. Os ensaios foram feitos em duplicado.

Os resultados mostram que a actividade enzimática é favorecida pela acção mecânica, para as três composições de celulasas. Outros autores (Buschle-Diller et al., 2001; Zeyer et al., 1994) já tinham mencionado a importância da agitação mecânica durante a hidrólise enzimática do algodão. A elevada acção mecânica “abre” o substrato permitindo que a enzima quebre a cadeia celulósica.

Em todos os tratamentos enzimáticos efectuados com o crude total (TC) obteve-se a maior actividade enzimática. Obteve-se uma perda de peso máxima de 24.5 e 43.8% no tratamento com baixa e elevada agitação mecânica respectivamente.

Nos tratamentos efectuados com CBH-rich não se verifica uma diferença significativa entre os tratamentos efectuados com baixa e elevada agitação mecânica. O efeito da agitação mecânica é mais pronunciado nos tratamentos

realizados com EG-rich. Verifica-se um aumento na actividade de 3.4 para 19%, o que está de acordo com resultados obtidos anteriormente (Cavaco-Paulo et al., 1996). O aumento da actividade de EG-rich com o aumento da agitação mecânica deve-se ao aumento dos sítios disponíveis para a adsorção da enzima (Cavaco-Paulo et al., 1996).

Os resultados obtidos também evidenciam a maior actividade “endo” que a celulase TC possui, porque a diferença entre os tratamentos com baixa e elevada agitação mecânica é bastante significativa para esta celulase. Este facto explica a elevada actividade em CMC obtida para esta enzima.

Apesar da agitação mecânica não afectar significativamente a actividade de CBH-rich (perdas de peso máximas obtidas foram de 22.5 e 24.3%) verifica-se que a perda de peso obtida com esta enzima, no tratamento com baixo nível de agitação mecânica (22.5%) é maior do que a actividade obtida no tratamento com elevado nível de agitação mecânica com EG-rich (19%). Este resultado evidencia, mais uma vez, a importância da presença da actividade de CBH na mistura para se conseguir a hidrólise da celulose.

O nível de agitação mecânica presente durante o tratamento enzimático é muito importante, como já foi demonstrado.

As amostras controlo (amostras tratadas nas mesmas condições mas sem enzima) não apresentam uma diferença significativa na perda de peso obtida com baixa e elevada agitação mecânica, podendo afirmar-se que é a combinação entre a acção da enzima e a agitação mecânica que provoca a degradação da celulose.

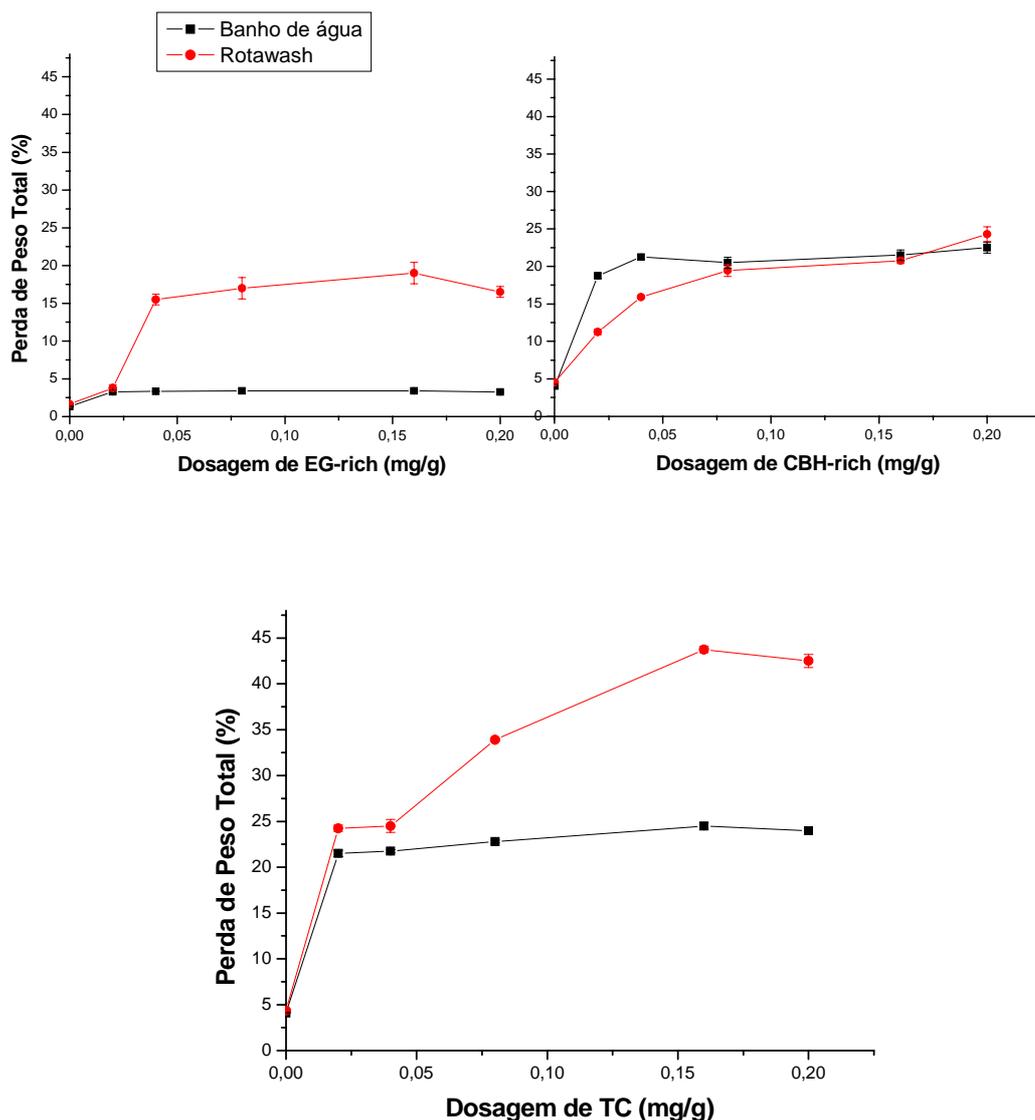


Figura 13: Variação da perda de peso total das amostras com a dosagem enzimática após 48 horas de tratamento, num banho de água e no Rotawash, com uma relação de banho de 1:200 a 50 °C.

Estes resultados podem ser reportados às fotografias de Microscopia Electrónica de Varrimento da figura 14. A figura 14a corresponde a uma amostra tratada com EG-rich com baixo nível de agitação mecânica (banho de água com agitação orbital), e pode observar-se que não existe degradação à superfície das fibras. Ao contrário, na fotografia 14b, é bem visível a degradação provocada pela agitação mecânica, o que prova mais uma vez a influência desta na actividade de EG-rich. As figuras 14c e 14d correspondem, respectivamente,

aos tratamentos com baixa e elevada agitação mecânica, das amostras de algodão com a celulase TC. Neste caso, é visível a acção da enzima sem agitação mecânica. Aparentemente, a degradação provocada pela acção enzimática é relativamente superficial. A elevada agitação mecânica vai remover as fibrilas da superfície, expondo novas camadas de fibra, o que favorece o ataque enzimático.

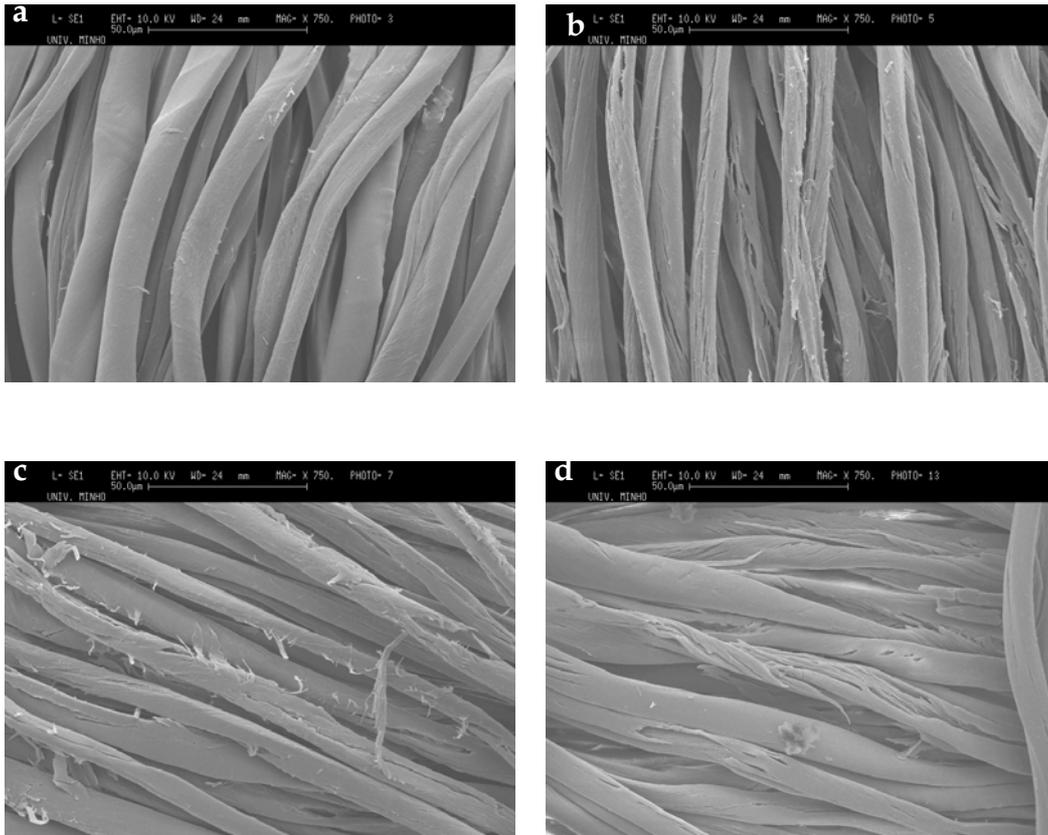


Figura 14: Fotografias de Microscopia Electrónica de Varrimento das amostras de algodão tratadas com 200 mg/g de EG-rich (a - baixo, b - elevado nível de agitação mecânica) e com 200 mg/g de TC (c - baixo, d - elevado nível de agitação mecânica).

De acordo com os resultados obtidos, a composição enzimática adequada ao objectivo do trabalho é uma celulase total (TC). Assim, os tratamentos enzimáticos seguintes foram efectuados com uma celulase comercial total, Celusoft L.

2.2 - Tratamento com Celusoft L

As amostras de algodão (0.5 g) foram tratadas com Celusoft L, celulase total comercial, com dosagens enzimáticas de 0.0, 10, 20, 100, 200, 400, 800 e 1600 mg/g, preparadas através da dissolução da enzima em 100 ml de solução tampão de acetato (0.1 M, pH 5). Todos os tratamentos foram efectuados no Rotawash (20 rpm). O elevado nível de acção mecânica foi conseguido através da adição de 9 discos de metal (20 g) aos copos de tratamento. No final do tratamento, as amostras foram removidas e tratadas como descrito em 2.5 para a determinação da actividade. Os ensaios foram feitos em duplicado.

Os resultados mostram, mais uma vez, que o elevado nível de acção mecânica favorece a actividade enzimática. O aumento da perda de peso obtido no tratamento efectuado com os discos é significativo. No tratamento de 1 hora o aumento de actividade foi de 4.5 para 18.8%, no tratamento de 2 horas a perda de peso das amostras aumentou de 7.5 para 100%. Estes resultados mostram também a influência da dosagem enzimática. Os valores de actividade obtidos no tratamento de 1 hora foram obtidos com uma dosagem enzimática de 200 mg/g enquanto que no tratamento de 2 horas, os valores de perda de peso foram obtidos com 100 mg/g. Verifica-se que a partir dos valores de dosagens mencionados, os valores de actividade (perda de peso) mantêm-se constantes. Isto corresponde a um nível de saturação da adsorção da enzima e ataque hidrolítico, à superfície das fibras. Para aumentar a actividade enzimática é desnecessário aumentar-se a concentração de enzima em solução. Deve actuar-se nas outras variáveis do processo, agitação mecânica e tempo de tratamento, para se atingir a hidrólise total. Este facto é comprovado pelos resultados obtidos na figura 16. Verifica-se que a hidrólise total do algodão (perda de peso de 100%) ocorre após duas horas de tratamento com elevado nível de agitação mecânica (Rotawash + discos) e com uma dosagem enzimática de 100 mg/g. Este resultado mostra, mais uma vez, a importância da combinação entre a acção da enzima e a agitação mecânica.

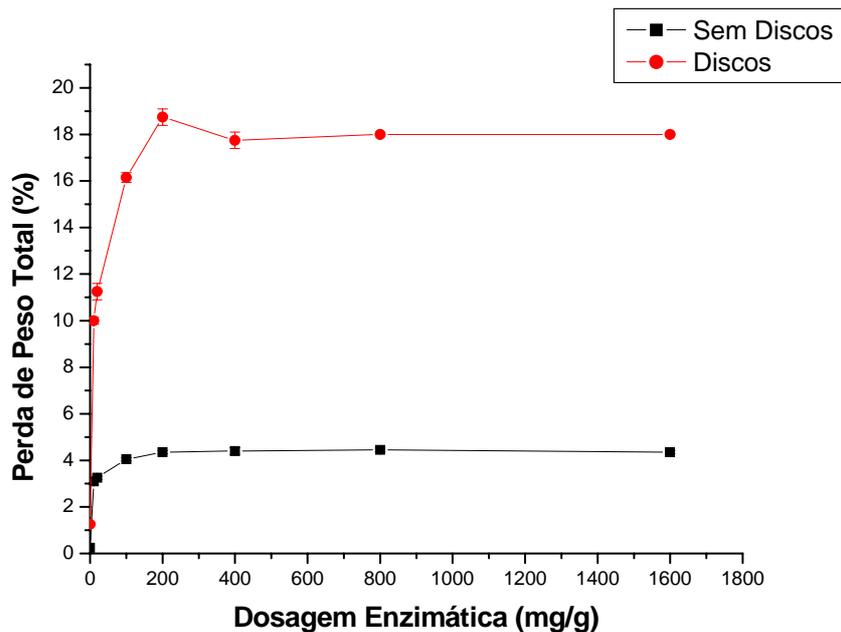


Figura 15: Variação da perda de peso total das amostras com a dosagem enzimática após 1 hora de tratamento no Rotawash, com uma relação de banho de 1:200 a 50 °C.

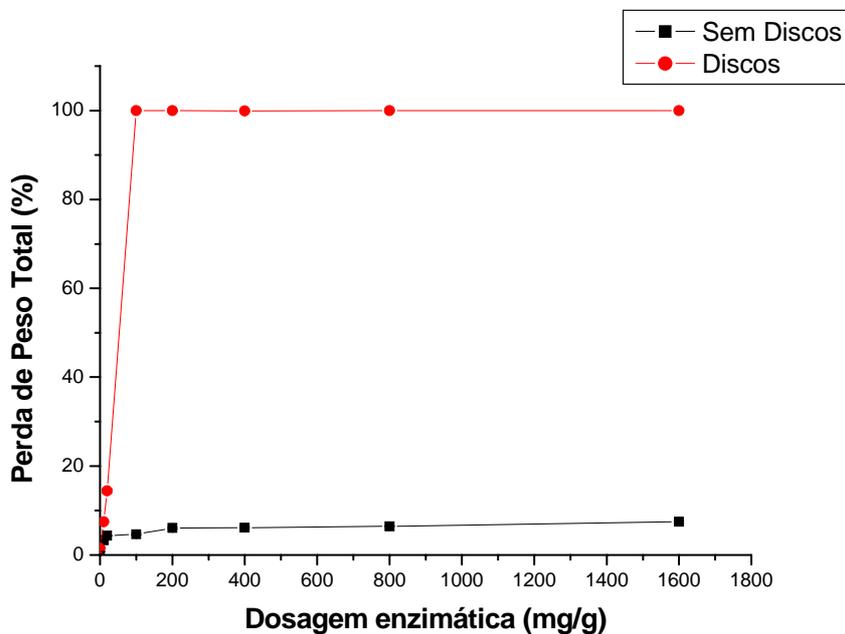


Figura 16: Variação da perda de peso total das amostras com a dosagem enzimática após 2 horas de tratamento no Rotawash, com uma relação de banho de 1:200 a 50 °C.

A figura 17 apresenta as fotografias de microscopia electrónica de varrimento das amostras de algodão tratadas com 200 mg/g de Celusoft L durante uma hora no Rotawash com baixo e elevado nível de agitação mecânica. Mais uma vez, pode observar-se que a amostra tratada com baixo nível de agitação mecânica apresenta uma superfície de fibra macia, sem degradação, enquanto que aumentando o nível de agitação mecânica, aumentam também as fibrilas e “fendas” nas fibras de algodão.

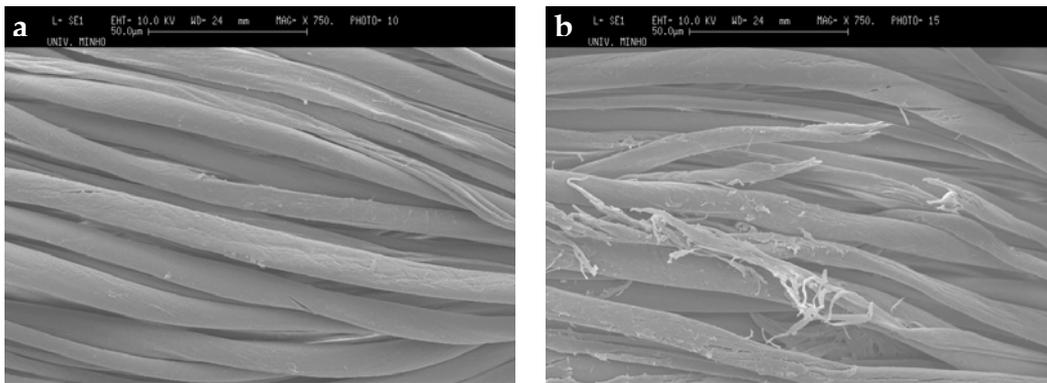


Figura 17: Fotografias de Microscopia Electrónica de Varrimento das amostras de algodão tratadas com 200 mg/g de Celusoft L (a - baixo nível de agitação mecânica, b - elevado nível de agitação mecânica).

Aplicando as condições anteriores (figura 16) a uma amostra de tecido de 10 g, a hidrólise total do algodão não se verifica. Utilizou-se a mesma dosagem enzimática (100 mg/g), no entanto a área do tecido aumentou consideravelmente (de 14 cm² para 630 cm², aproximadamente). Logo, como a quantidade de enzima por unidade de superfície que está a actuar, diminuiu, a hidrólise também foi menor. Há a produção de material fibrilar mas a estrutura principal do tecido permanece intacta.

As perdas de peso obtidas com elevada acção mecânica são acompanhadas pela produção de algodão microfibrilar. Verifica-se que ao mesmo tempo que a perda de peso total das amostras aumenta com o número de discos (elevado nível de agitação mecânica), a quantidade de matéria insolúvel também aumenta. Esta é designada por perda de peso insolúvel e é obtida por filtração do líquido resultante do tratamento.

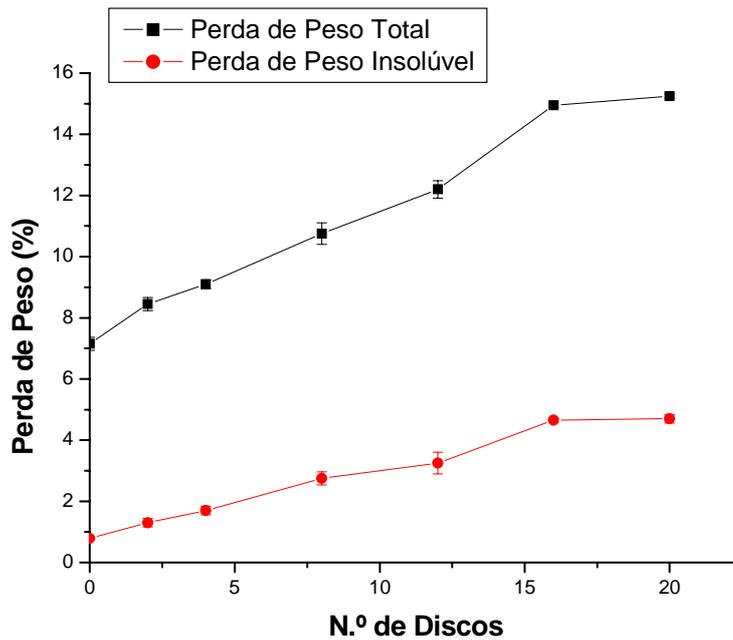


Figura 18: Variação da perda de peso das amostras com o número de discos após 2 horas de tratamento no Rotawash, com uma dosagem enzimática de 20 mg/g e uma relação de banho de 1:10 a 50 °C.

Através dos resultados obtidos (figura 15) verificou-se que se atingiu a zona de saturação da enzima para um valor de dosagem de 100 mg/g, e para aumentar a actividade enzimática teria que se actuar nas outras variáveis do processo, agitação mecânica e tempo de tratamento.

Verifica-se que aumentando o nível de agitação mecânica (Rotawash + 15 discos) e o tempo de tratamento, atinge-se a degradação total do algodão, isto é, a amostra é completamente transformada em material fibrilar (figura 20). A hidrólise total de uma amostra de algodão (10 g) foi obtida após 6 horas de tratamento com elevado nível de agitação mecânica e uma dosagem de 100 mg/g (figura 19).

O tempo de tratamento é fundamental para a hidrólise total da celulose, no entanto, a obtenção desta é uma acção conjunta entre acção da enzima, acção mecânica e tempo de tratamento.

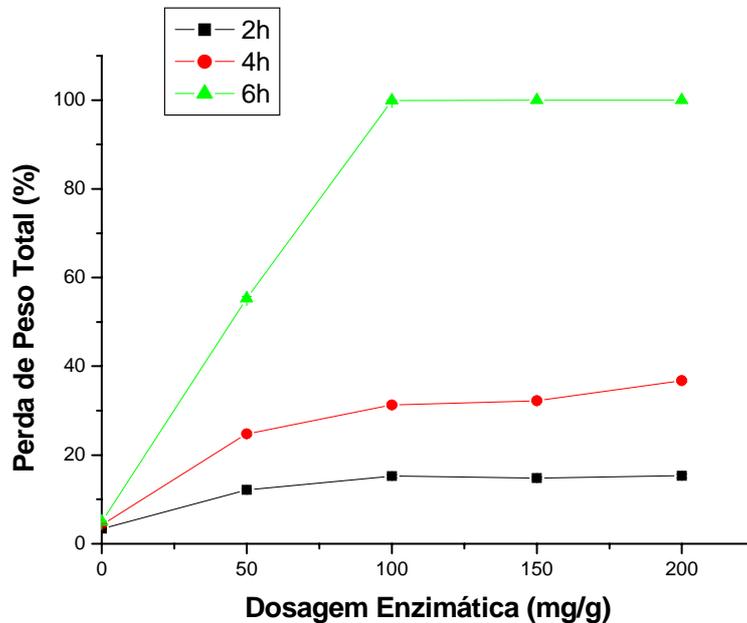


Figura 19: Variação da perda de peso das amostras com a dosagem enzimática após 2, 4 e 6 horas de tratamento no Rotawash, com uma relação de banho de 1:25 a 50 °C e alto nível de acção mecânica (15 discos).

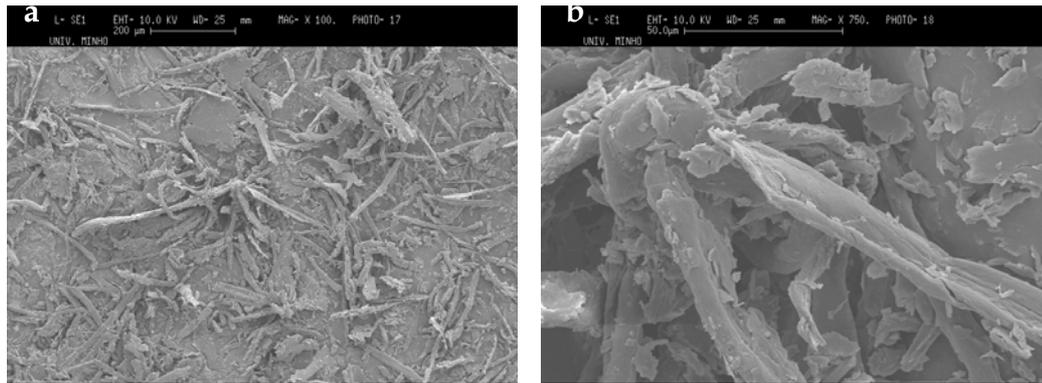


Figura 20: Fotografias de microscopia electrónica de varrimento do material fibrilar que permanece no líquido de tratamento com uma amplificação de a) 100 vezes e b) 750 vezes.

A optimização das condições de tratamento, em que se obtém a hidrólise total da celulose, foi o principal objectivo deste estudo. As condições óptimas de tratamento, atingidas com um tecido 100% algodão, são:

- Dosagem enzimática elevada (100 mg/g);
- Elevado nível de agitação mecânica (Rotawash + 15 discos);
- Tempo de tratamento longo (6 horas);

3- Tratamento da mistura de Poliéster/Algodão

A figura 20 mostra os resultados que se obtiveram quando se aplicaram as condições óptimas de tratamento a uma mistura de PES/CO (34/66%). Ao fim de 6 horas de tratamento, obteve-se uma perda de peso máxima de 45%. Com a finalidade de se hidrolizar completamente a celulose da mistura (obter uma perda de peso de 66%), aumentou-se a dosagem enzimática e o tempo de tratamento. Obteve-se uma perda de peso máxima de 55% após 9 horas de tratamento com elevado nível de agitação mecânica e uma dosagem de 200 mg/g (figura 22). Este valor corresponde à hidrólise máxima que se consegue obter na mistura poliéster/algodão.

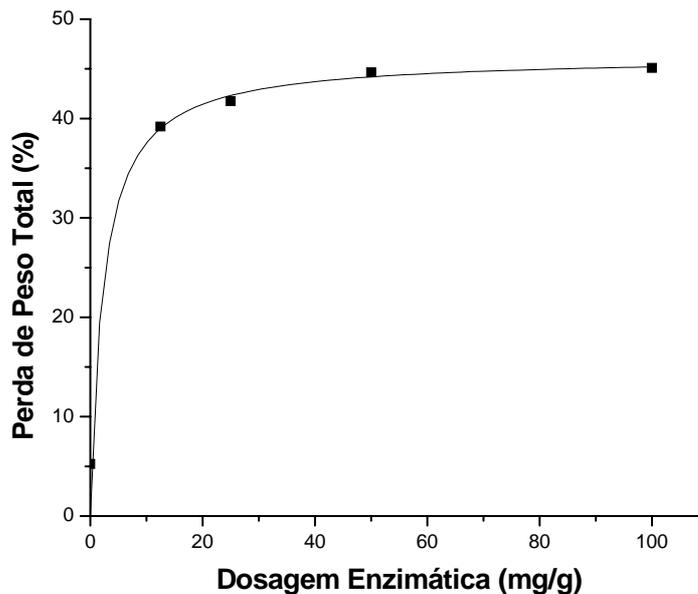


Figura 21: Variação da perda de peso total das amostras com a dosagem enzimática após 6 horas de tratamento no Rotawash, com uma relação de banho de 1:25 a 50 °C e alto nível de acção mecânica (15 discos).

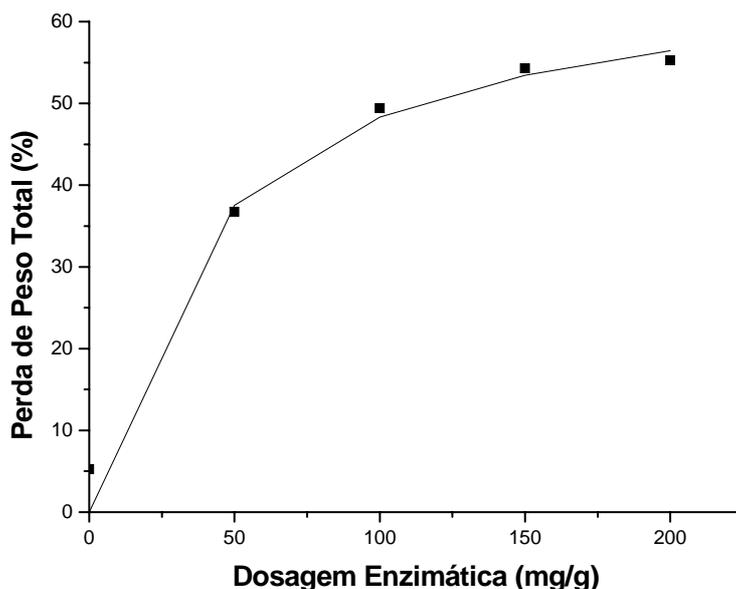


Figura 22: Variação da perda de peso total das amostras com a dosagem enzimática após 9 horas de tratamento no Rotawash, com uma relação de banho de 1:25 a 50 °C e alto nível de acção mecânica (15 discos).

Foi realizado um ensaio com 12 horas de tratamento, e observou-se que as perdas de peso obtidas não aumentaram, sendo até, em algumas amostras, menores do que no tratamento de 9 horas. Isto pode ser indicativo que a enzima chegou a um nível de saturação. Os resultados da tabela 7 também evidenciam este facto.

Tabela 7: Valores de perda de peso total das amostras em função do tempo de incubação.

Amostra	Perda de peso total (%)			
	2h	4h	6h	9h
CO	15.25	31.3	100	-
PES/CO	-	-	45.1	49.4

Os resultados da tabela 7 foram obtidos nas mesmas condições (10g de tecido, 100 mg/g de proteína, relação de banho de 1:25 e 15 discos), e apesar de não serem totalmente comparativos, pode-se inferir acerca do nível de degradação que se pode obter.

Verifica-se que no algodão a hidrólise inicial é relativamente baixa e linear porque aumentando o tempo de tratamento para o dobro, a perda de peso também aumenta aproximadamente para o dobro. A baixa hidrólise inicial pode dever-se à pequena quantidade de material fibrilar na superfície da fibra (figura 23a). Prolongando-se o tratamento, a hidrólise aumenta substancialmente, e ao fim de 6 horas de tratamento, obtém-se a degradação completa.

Como o objectivo principal deste estudo era obter as condições óptimas ao fim das quais se obtém a hidrólise total da celulose, não foram realizados ensaios de 2 e 4 horas de tratamento da mistura de PES/CO, tal como foi feito para o algodão.

Comparando os valores de perda de peso ao fim de 6 horas de tratamento nos dois substratos, verifica-se que a hidrólise da celulose da mistura é significativamente menor, e mantém-se relativamente constante com a continuação do tratamento. Por este motivo se pode dizer que a perda de peso máxima obtida na mistura, 55%, não sofreria alterações significativas com o tempo de tratamento.

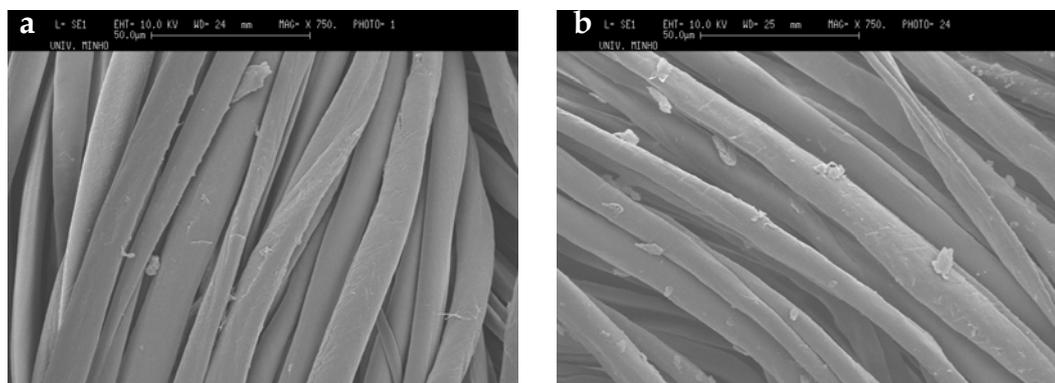


Figura 23: Fotografias de microscopia electrónica de varrimento das amostras não tratadas de a) algodão e b) poliéster/algodão.

A degradação enzimática de tecidos celulósicos depende de vários factores. A estrutura fina da fibra tem um papel muito importante, no entanto, os resultados obtidos evidenciam a influência de factores macroscópicos como a densidade e a construção de um tecido.

Partindo do pressuposto que a celulose num tecido 100% algodão é igual à celulose numa mistura poliéster/algodão, seria de esperar que nas condições óptimas, se obteria a hidrólise total da celulose da mistura. Porém, isto não aconteceu, por um lado devido à maior densidade da mistura PES/CO que retarda o ataque da enzima. Por outro lado, apesar dos tecidos possuírem o mesmo debuxo (tafetá) na mistura, os fios da teia são de PES/CO e o mesmo acontece com os fios da trama, o que torna bastante difícil o acesso da enzima ao substrato. A fibra de poliéster funciona como uma barreira à enzima, diminuindo desta forma a hidrólise.

Na figura 24 estão representadas as fotografias de microscopia electrónica de varrimento, das amostras de PES/CO não tratadas, tratadas com enzima e com ácido sulfúrico. À amostra tratada com enzima corresponde uma perda de peso de 55%, e a amostra tratada com ácido possui uma perda de peso de 66%, ou seja, a degradação da celulose foi total devido à capacidade do ácido em solubilizar a mesma. Na amostra tratada com celulase, são ainda visíveis algumas fibras de algodão (figura 24d_{ii}), o que evidencia a limitação do tratamento enzimático em relação ao tratamento acídico.

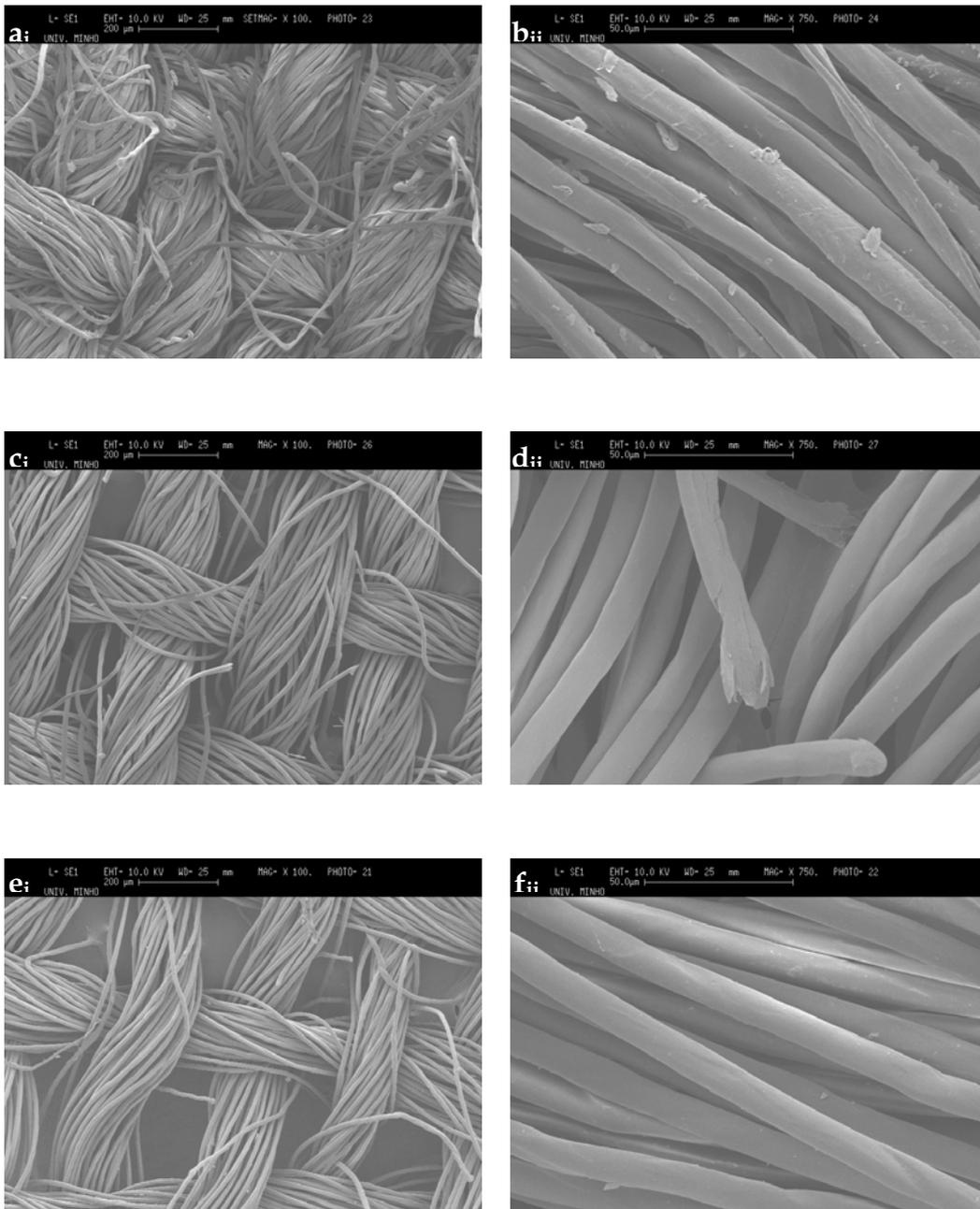


Figura 24: Fotografias de Microscopia Electrónica de Varrimento das amostras de poliéster/algodão não - tratadas (a e b), tratadas com Celusoft L, 55% de PP, (c e d) e tratadas com ácido sulfúrico, 66% de PP, (e e f). (Amplificação de i - 100,ii - 750 vezes)

3.1 - Ensaio físicos

As figuras 25, 26 e 27 representam respectivamente a variação da flexão, e da força máxima e o alongamento à ruptura com a perda de peso total das amostras. Como seria de esperar, aumentando a perda de peso das amostras, a flexão, a força e o alongamento à ruptura diminuem.

Verifica-se que a flexão obtida para a amostra “esqueleto” é maior do que a flexão obtida na amostra com uma perda de peso de 55%. Uma vez que no “esqueleto” toda a celulose foi removida (perda de peso de 66%), seria de esperar que a flexão fosse menor.

Este facto pode ser explicado pelo aumento da rigidez no tecido devido ao tratamento com ácido sulfúrico. Este torna a superfície das fibras mais ásperas, o que provoca o aumento na flexão. O tratamento com enzima provoca o “polimento” das fibras, tornando-as mais macias, diminuindo desta forma a flexão. Não se observa uma diferença significativa entre a flexão à teia e à trama das amostras.

A força e o alongamento à ruptura diminuem com o aumento da perda de peso total. Verifica-se que a força à ruptura é maior para os fios da teia, observando-se o mesmo comportamento no alongamento. Considerando a amostra tratada enzimaticamente, em que se obteve uma perda de peso de 55%, verifica-se que esta mantém 30 % da resistência inicial, à teia e trama, enquanto que a amostra “esqueleto” apenas mantém cerca de 21% à teia e 18% à trama. Como a perda de peso do “esqueleto” é maior, este resultado está de acordo com este facto.

Na figura 28 está representada a variação do coeficiente de atrito cinético das amostras de PES/CO com diferentes perdas de peso. Os ensaios foram efectuados com duas pressões de contacto, 3.5 e 10 kPa.

Mediu-se o coeficiente de atrito da amostra sem tratamento, tecido original (1), das amostras tratadas enzimaticamente onde se obteve uma perda

de peso de 45% e 55% (2 e 3 respectivamente) e a amostra tratada com ácido sulfúrico (4).

Nos ensaios efectuados com 10 kPa verifica-se que, se considerar apenas 2, 3 e 4, o coeficiente de atrito aumenta. Este resultado está de acordo com outros obtidos anteriormente onde se verificou que o coeficiente de atrito aumenta com a evolução dos processos (Lima et al., 2004). Neste caso, o coeficiente de atrito aumenta à medida que a perda de peso aumenta. Assim, seria de esperar que a amostra original apresentasse o coeficiente de atrito menor, o que não se verificou. O coeficiente de atrito da amostra original é da ordem do que se obteve para a amostra esqueleto.

Nos ensaios efectuados com 3.5 kPa verifica-se que o coeficiente de atrito é maior para todas as amostras, o que comprova resultados anteriores. Verifica-se que a diminuição da pressão de contacto, provoca o aumento do coeficiente de fricção (Lima et al., 2004).

Observa-se também o mesmo comportamento obtido com uma pressão maior, ou seja, o coeficiente de atrito aumenta com a perda de peso, no entanto a amostra original obtém um coeficiente de atrito próximo daquele obtido para a amostra esqueleto.

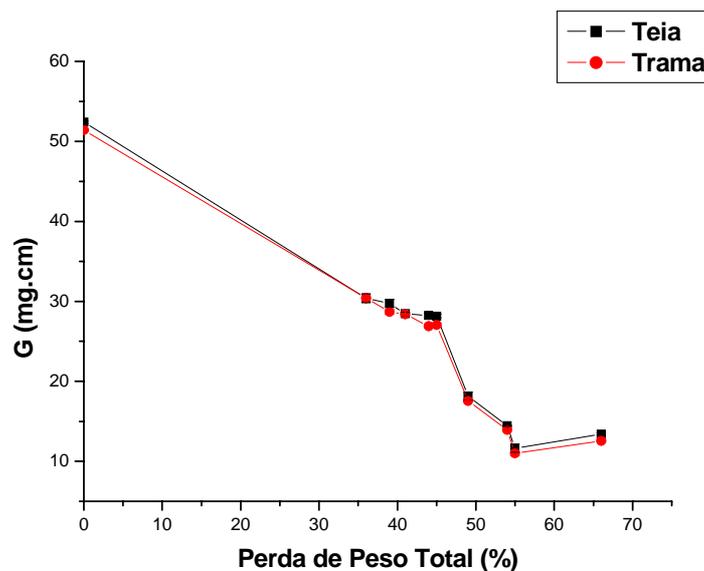


Figura 25: Variação da flexão (G) do tecido com a perda de peso total.

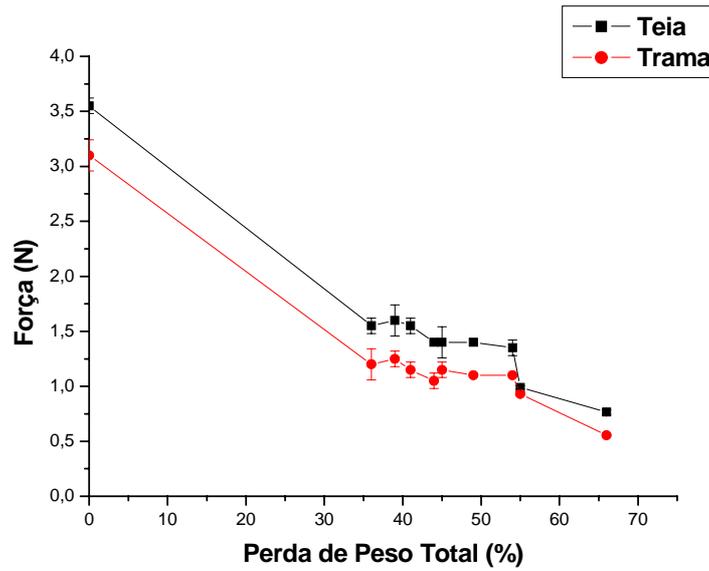


Figura 26: Variação da força máxima à ruptura do tecido com a perda de peso total.

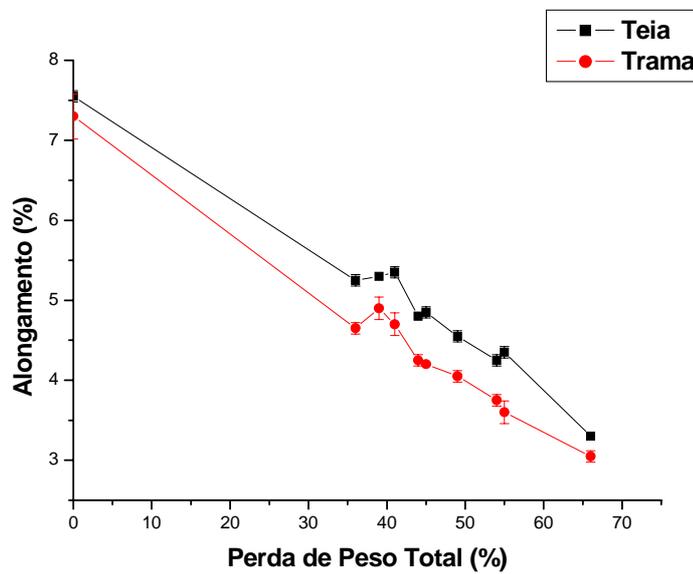


Figura 27: Variação do alongamento à ruptura do tecido com a perda de peso total.

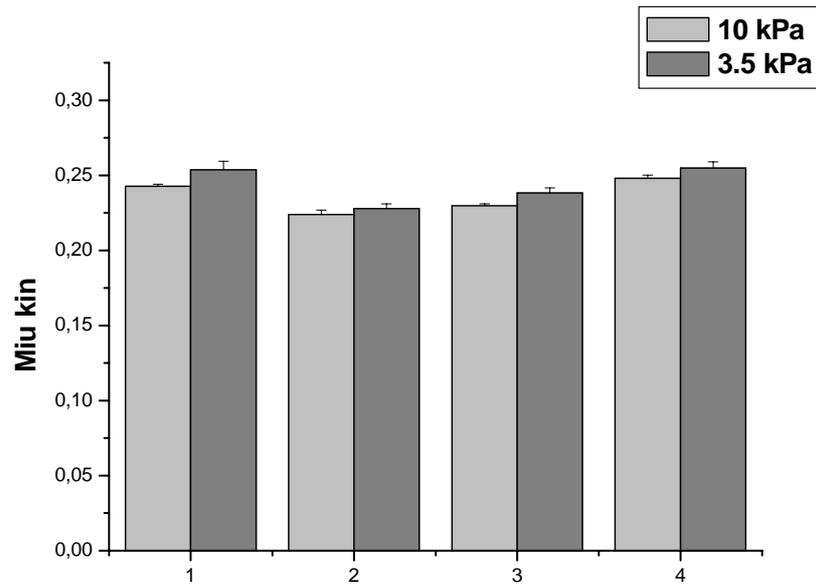


Figura 28: Variação do atrito cinético (μ_{kin}) das amostras de PES/CO em diferentes estágios, obtidas com uma pressão de contacto de 3.5 e 10 kPa. (1- 0% PP; 2- 45% PP; 3- 55% PP; 4- 66% PP)

V CONCLUSÃO

A caracterização das celulasas utilizadas foi feita de acordo com as metodologias descritas em 2.5 e 2.6.

Verificou-se que a celulase EG-rich possui a maior actividade em CMC, o que confirma a sua actividade endo. No entanto, esta enzima possui a menor actividade no algodão. Por sua vez, a enzima Celusoft L, que possui a menor actividade em CMC, tem mais actividade no algodão do que as restantes.

A composição da mistura celulolítica é um factor determinante na interpretação dos parâmetros de controlo da hidrólise do algodão. Estudou-se o efeito da composição da mistura enzimática na hidrólise, com baixo e alto nível de agitação mecânica. Verificou-se que a actividade enzimática, expressa em termos de perda de peso das amostras, é favorecida pela acção mecânica nas três composições estudadas. Porém, a actividade enzimática é maior nos tratamentos efectuados com o crude total (TC), o que confirma a importância do sinergismo entre os vários componentes da enzima na degradação do algodão.

A optimização das condições de tratamento foi feita usando uma celulase total comercial, Celusoft L. Estudou-se o efeito de três variáveis, agitação mecânica, dosagem enzimática e tempo de tratamento, na hidrólise do algodão. Verificou-se que o factor determinante na hidrólise total foi o tempo de tratamento.

A hidrólise total do algodão foi conseguida após 6 horas de tratamento com elevado nível de agitação mecânica (Rotawash + discos) e uma dosagem enzimática de 100 mg/g.

Aplicando as mesmas condições à mistura de poliéster/algodão, obteve-se uma perda de peso máxima de 45%. Na tentativa de conseguir hidrolizar toda a celulose presente na mistura aumentou-se a dosagem enzimática e o tempo de tratamento, obtendo-se uma perda de peso máxima de 55%. Estes

resultados mostram a importância de factores macroscópicos como a densidade e a construção de um tecido na hidrólise do mesmo.

Comparando as propriedades físicas, flexão e resistência, das amostras tratadas enzimaticamente (considera-se aquela em que se obteve uma perda de peso de 55%) com a amostra tratada com ácido sulfúrico (denominada “esqueleto”), verifica-se que a flexão e a perda de resistência são maiores para o “esqueleto”. Nesta amostra, devido à capacidade do ácido sulfúrico solubilizar a celulose, toda a celulose foi removida da mistura, pelo que tal como se esperava, houve uma maior perda de resistência. No entanto, esperar-se ia que a flexão fosse menor, o que não se verificou. Pode então concluir-se que o tratamento com ácido sulfúrico torna a superfície das fibras mais ásperas, rígidas, o que provoca o ligeiro aumento da flexão.

Mediu-se também o coeficiente de fricção das amostras acima referidas. Verifica-se que o coeficiente de atrito aumenta com o aumento da perda de peso, sendo portanto maior para a amostra tratada com ácido sulfúrico. Este resultado contraria os resultados de flexão obtidos para o “esqueleto”. Um coeficiente de atrito maior indica que o tecido é mais macio, no entanto uma maior flexão demonstra uma maior rigidez do tecido. O número de ensaios efectuados para a flexão e para a medição do coeficiente de atrito foram muito poucos, pelo que não se pode concluir acerca de qual o tratamento que torna o tecido mais macio.

Do ponto de vista industrial, as condições óptimas estudadas neste trabalho, não são aplicáveis. A hidrólise total do algodão é atingida após um tratamento logo e com uma elevada dosagem enzimática, o que não é economicamente viável.

A obtenção de tecidos de poliéster de baixo peso com ácido sulfúrico é um processo rápido e relativamente económico. No entanto, comparando com o tratamento enzimático, a perda de resistência é maior. Considerando os fios da trama, a amostra tratada com Celusoft L mantém 30% da resistência inicial,

enquanto que o “esqueleto” mantém apenas 18%, considerando-se aceitável uma perda de resistência até 10% (Buschle-Diller et al., 1994). Apesar dos valores obtidos nos dois casos não serem aceitáveis, pode concluir-se que a obtenção enzimática de tecidos de poliéster de baixo peso é uma alternativa a considerar devido à menor perda de resistência que se obtém mas também devido às vantagens ecológicas e de processo.

VI PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudo evidenciou que a obtenção enzimática de tecidos de poliéster de baixo peso tem algumas vantagens relativamente ao processo ácido, nomeadamente, menor perda de resistência mecânica, vantagens ecológicas e de processo. No entanto, as condições em que se obtém um tecido leve não são comercialmente viáveis. Pelo que devem ser efectuados novos estudos no sentido de aplicar este processo industrialmente, tais como:

- Estudar melhor outros parâmetros como diferentes tipos de agitação;
- Estudar a possibilidade de reutilizar a enzima após o processo, evitando desta forma o gasto excessivo da mesma;
- Revestir os fios de poliéster, de modo a aumentar a sua resistência, e estudar o efeito deste acabamento na hidrólise do algodão;

VII REFERÊNCIAS

Araújo M., E. M. de Melo e Castro. Manual de Engenharia têxtil. Fundação Calouste Gulbenkian. Volume I. 1986

Asferg, L. O. e Videbaek, T. Softening and polishing of cotton fabrics by cellulose treatment. ITB 2, 5 - 8. 1990

Atalla, R. H. The structures of native celluloses. Proc. of the 2th Tricel: symposium on *Trichoderma reesei* cellulases and other hydrolases. (P. Suominen, T. Reinikainen, Eds.), Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research. Vol. 8, Helsinquia, 281 - 290. 1993

Barbosa M. C., Silveira da Rosa S. E., Correa A. R., Dvorsak P. e Gomes G. L. Sector de fibras sintéticas e suprimento de intermediárias petroquímicos. Complexo Têxtil. 2004

Beguin, P. e Aubert, J. P. The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiol. Rev. 13: 25 - 58. 1994

Bhat, M. K. e Bhat, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. Biotechnol. Adv., 15, 583 - 620. 1997

Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248 - 254. 1976

Buschle-Diller, G., Zeronian, S.H., Pan, N. e Yoon. M. Y. Enzymatic hydrolysis of cotton, linen, ramie and viscose rayon fabrics. Textile Res. J. 64 (5), 270 - 279. 1994

Buschle-Diller, G., Yang, X. D. e Yamamoto, R. Enzymatic bleaching of cotton fabric with glucose oxidase. *Textile Res. J.* **71** (5). 388 - 394. 2001

Cavaco-Paulo, A. Influência da agitação mecânica e da composição enzimática no tratamento do algodão com celulases. Dissertação de doutoramento. Escola de engenharia, Universidade do Minho, 1995

Cavaco-Paulo, A., Almeida, L. e Bishop, D. Effects of agitation and endoglucanase pre-treatment on hydrolysis of cotton fabrics by a total cellulase. *Textile Res. J.* **66** (5), 287 - 294. 1996

Cavaco-Paulo, A., Morgado, J. Almeida, L. e Kilburn, D. Indigo back staining during cellulase washing. *Textile Res. J.* **68** (6), 398 - 401. 1998a

Cavaco-Paulo, A. Processing textile fibers with enzymes: an overview. Em: Eriksson, K.-E. L. e Cavaco-Paulo, A. (Eds). *Enzyme applications in fiber processing*. Washington, DC: ACS. ACS Symp. Ser. 687, 180 - 189. 1998b

Cavaco-Paulo, A., Almeida, L. e Bishop, D. Hydrolysis of cotton cellulose by engineered cellulase from *Trichoderma reesei*. *Textile Res. J.* **68** (4), 273 - 280. 1998c

Cavaco-Paulo, A. Improving dimensional stability of cotton fabrics with cellulase enzymes. *Textile Res. J.* **71** (9), 842 - 843. 2001

Chanzy, H. e Henrissat, B. Undirection degradation of Valonia cellulose microcrystals subjected to cellulase action. *FEBS Lett.* **184**, 285 - 288. 1985

Clarkson, K., Larenas, E. e Weiss, G. Method for treating cotton - containing fabric with cellulases. PCT WO 92/29426. 1992

Csiszár, E., Szakács, G. e Rusznák, I. Combining traditional cotton scouring with cellulase enzymatic treatment. *Textile Res. J.* **68** (3), 163 – 167. 1998

Cortez, J., Ellis, J. e Bishop, D. Using cellulases to improve dimensional stability of cellulosic fabrics. *Textile Res. J.* **72** (89), 673 – 680. 2002

Ehret, S. Blue jeans: a comprehensive denim-finishing programme. *International Dyer*. Julho, 27 – 31. 1994

Enari, T. M. e Markkanen, P. Production of cellulolytic enzymes by fungi. *Adv. Biochem. Eng.* **5**, 1 - 24 . 1997

Gama P., F. M. Mecanismo bioquímico da acção de celulases de *Trichoderma reesei*. Dissertação de doutoramento. Universidade do Minho. Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia Biológica, 1996

Guillen, J. G. e Garrido, J. M. Algodon y celulosa : estructura e propiedades Universidade Politécnica da Catalunha, Terrassa 1987

Guillen, J. G. Fibras de poliester. 2ª ed. Universidade Politécnica da Catalunha, Terrassa, 1991

Hartzell, M. M. e Hsieh, Y. L. Enzymatic scouring to improve cotton fabric wettability. *Textile Res. J.* **68** (4), 233 – 241. 1998

Heikinheimo, L. *Trichoderma reesei* cellulases in processing of cotton. Dissertação de doutoramento. VTT Publications 483, Espoo, Finlândia. 2002

Irwin, D. Spezio, M., Walker, L. e Wilson, D. Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism and binding domain efforts. *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 1002 – 1013. 1993

Klahorst, S., Kumar, A. e Mullins, M. M. Optimising the use of cellulases for denim finishing. Book Pap. – Int. Conf. Exhib, AATCC, 243 – 249. 1992

Kochavi, D., Videbaek, T. e Cadroni, D. Optimising processing conditions in enzymatic stonewashing. American Dyestuff Reporter, Setembro, 26 – 28. 1990

Kraulis, P. J., Clore, G. M., Nilges, M., Jones, T. A., Pettersson, G., Knowles, J. e Gronenborn, A. M. Determination of the three dimensional solution structure of the C- terminal domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. A study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry – dynamical simulated annealing. Biochemistry **28**, 7241 - 7257. 1989

Kubicek, C.P. The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. Adv. Biochem. Eng. /Biotechnol. (Vol. **45**) (A. Fiechter, Ed.), 1 – 27. 1992

Kumar, A. e Harnden, A. Cellulase enzymes in wet processing of Lyocell and its blends. Textile Chemist and Colorist & American Dyestuff Reporter **1**, 37 – 41. 1999

Li, Y. e Hardin, I. R. Enzyme scouring of cotton – surfactants, agitation and selection of enzymes. Textile Chemist and Colorist **30** (9), 23 – 29. 1998

Lima M., Lubos Hes, Vasconcelos R., Martins J. FRICTORQ, accessing fabric friction with a novel fabric surface tester. World Textile Conference – 4th AUTEX Conference. Roubaix, Junho 22 – 24. 2004

Lin, C. H. e Hsieh, Y. L. Direct scouring of greige cotton fabrics with proteases. Textile Res. J. **71** (5), 425 – 434. 2001

Lund, H. e Pedersen, H. A method of obtaining a cellulosic textile fabric with reduced tendency to pilling formation. WO 96/17994. 1994

Miettinen-Oinonen, A., Elovainio, M. e Suominen, P. Cellulase composition for biofinishing cellulose - containing textile materials. Patente Americana 5,874,293. 1997a

Morgado, J., Rousselle, M.-A. e Cavaco-Paulo, A. Enzymatic treatment of Lyocell - clarification of depilling mechanisms. Textile Res. J. **70** (8), 696 - 699. 2000

Nidetzky, B., Hayn, M., Macarrón, R. e Steiner, W. Synergism of *Trichoderma reesei* cellulases while degrading different celluloses. Biotechnol. Lett. **15** (1), 71 - 76. 1993

Norma Portuguesa NP 2248:1998, Têxteis - Misturas binárias de fibras - Análise Quantitativa

Norma Portuguesa NP EN ISSO 13934 - 1: 2001. Propriedades de tracção dos tecidos. Parte 1: Determinação da força máxima e do alongamento à força máxima pelo método da tira

Norma Inglesa BS 3356:1961 (Handbook 11:1974). Determination of Stiffness of cloth

Pere, J., Puolakka, A., Nousiainen, P. e Buchert, J. Action of purified *Trichoderma reesei* cellulases on cotton fibers and yarn. J. Biotechnol. **89**, 247 - 255. 2001

Reinikainen, T. The cellulose - binding domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. Interaction with cellulose and application in protein

immobilization. Dissertação de doutoramento. VTT Publications 206. Espoo, Finlândia. 1994

Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T., Knowles, J. K. C. e Jones, T. A. Three dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science* **249**, 380 - 386. 1990

Saloheimo, M., Nakari-Setälä, T., Tenkanen, Me Penttilä, M. cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast. *Eur. J. Biochem.* **249**, 584 - 591. 1997

Saloheimo, M., Kuja-Panula, J., Ylösmäki, E., Ward, M. e Penttilä, M. Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* β -glucosidase BGLII (Cel 1A). *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4546 - 4553. 2002

Sinnot, M. L. Catalytic mechanisms of enzyme glycosyl transfer. *Chem. Rev.* **90**, 1171 - 1202. 1990

Srisodsuk, M. Mode of action of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I on crystalline cellulose. Dissertação de doutoramento. VTT Publications 188, Espoo, Finlândia. 1994

Taylor, J. Tencel - a unique cellulosic fibre. *JSDC* **114**, 191 - 193. 1998

Teeri, T. T. crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnol.* **15**, 160 - 167. 1997

Tyndall, M. Upgrading garment washing techniques. *American Dyestuff Reporter*, Maio, 22 - 30. 1990

Tyndall, R. M. Application of cellulase enzymes to cotton fabrics and garments. *Textile Chemist and Colorist*. **24** (6), 23. 1992

Vanhanen, M., Tuomi, T., Tiikkainen, U., Tupasela, O., Voutilainen, R. e Nordman, H. Risk of enzyme allergy in the detergent industry. *Occup. Environ. Med.* **57**, 121 - 125. 2000

Vrsanská, M. e Biely, P. The cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* QM 9414: action and cello-oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* **227**, 19 - 27. 1993

Wood, T. M. Mechanism of cellulose degradation by enzymes from aerobic and anaerobic fungi. In: Coughlan, M. P. (Ed). *Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation*. Elsevier, London. Pp. 17 - 35. 1989

Wood, T. M. Fungal cellulases. *Biochem. Soc. Transact.* **20**, 46 - 52. 1992

Yingling, G. L. Safe handling of enzymes. *Textile Chemist and Colorist & American Dyestuff Reporter* **32** (1), 26 - 27. 2000

Zeyer, C., Rucker, J. W., Joyce, T. W. and Heitmann, J. A. Enzymatic deinking of cellulose fabric. *Textile Chemist and Colorist* **26** (3), 26 - 31. 1994