

ESTUDOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE
LIMPEZA CONTENDO PROTEASE DE *Bacillus* sp. SMIA-2, USANDO A
METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

LARISSA PACHECO FERREIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
AGOSTO - 2018

ESTUDOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE
LIMPEZA CONTENDO PROTEASE DE *Bacillus* sp. SMIA-2, USANDO A
METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

LARISSA PACHECO FERREIRA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof^ª. Meire Lelis Leal Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
AGOSTO - 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas Elaborada com os dados
fornecidos pela autora.

F383 Ferreira, Larissa Pacheco.

ESTUDOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE LIMPEZA
CONTENDO PROTEASE DE *Bacillus* sp. SMIA-2, USANDO A METODOLOGIA DE
SUPERFÍCIE DE RESPOSTA / Larissa Pacheco Ferreira. - Campos dos Goytacazes, RJ,
2018.

65 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2018.
Orientadora: Meire Lelis Leal Martins.

1. Surfactantes. 2. Oxidante. 3. Detergente enzimático. 4. Metodologia de
superfície de resposta. 5. Delineamento Composto Central Rotacional. I.
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

ESTUDOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE
LIMPEZA CONTENDO PROTEASE DE *Bacillus* sp. SMIA-2, USANDO A
METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

LARISSA PACHECO FERREIRA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 30 de agosto de 2018.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Luana Pereira de Moraes (Ph.D. Ciências e Tecnologia de Alimentos) - UENF

Silvia Menezes de Faria Pereira (D.Sc. Engenharia e Ciências dos Materiais) - UENF

Luciana Ribeiro Coutinho de Oliveira Mansur (D.Sc. Produção Vegetal) -
Universidade Estácio de Sá

Prof^a. Meire Lelis Leal Martins (Ph.D. Molecular Biology and Biotechnology) - UENF
(Orientadora)

Dedico este trabalho à minha família, em especial, à minha avó Aparecida, à minha mãe Aurelina (in Memoriam) e às minhas tias Isabel e Márcia, por todo auxílio, paciência e carinho nesta caminhada.

AGRADECIMENTO

À minha família, por todo apoio durante minha caminhada;

A Oswaldo, pela companhia aos finais de semana e no período noturno, que precisei realizar os experimentos;

À professora Meire Lelis Leal Martins, pela orientação, pelo incentivo, compreensão e todo profissionalismo durante o curso;

À professora Luana Pereira de Moraes, por toda ajuda na utilização do programa Statistic;

Aos integrantes da banca, Luana, Sílvia e Luciana, por aceitarem contribuir com esse trabalho;

À Técnica Ana Lúcia, por todo apoio e auxílio durante minhas atividades no laboratório;

Às amigas do LTA, em especial a Érica, por todo apoio e amizade recebidos durante este período;

A todos os meus amigos, que mesmo longe na distância, permaneceram pertos no coração, e contribuíram com mensagens de incentivo;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. <i>Enzimas em formulações de detergentes</i>	16
2.1.1. Proteases	17
2.2. <i>Agentes de Limpeza</i>	19
2.2.1. Surfactantes	20
2.2.2. Alvejantes e <i>builders</i>	23
3. OBJETIVOS	25
3.1. <i>Objetivo geral</i>	25
3.2. <i>Objetivos específicos</i>	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. <i>Obtenção do extrato enzimático</i>	26
.....	28

4.2. Determinação da atividade de protease	29
4.3. Compatibilidade e estabilidade da protease com componentes utilizados na formulação de detergentes	29
4.4. Planejamento fatorial fracionado	30
4.5. Efeito do desempenho de Lavagem	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Compatibilidade de proteases com componentes utilizados na formulação de detergentes.....	34
5.2. Estabilidade de proteases de <i>Bacillus sp</i> SMIA-2 com componentes utilizados na formulação de detergentes.	37
5.3. Planejamento Fatorial Fracionado	40
5.3.1. Otimização da concentração de surfactante, temperatura e tempo de exposição.....	41
5.3.2. Otimização de concentração de oxidante, temperatura e tempo de exposição.....	46
5.3.3. Otimização da concentração de surfactante, concentração de oxidante e tempo de exposição.....	52
5.4. Efeito do desempenho de lavagem	57
6. CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Temperatura e pH de atuação de algumas proteases disponíveis no mercado (Novo Nordisk S/A, Bagsvaerd, Denmark) e das proteases produzidas pela cepa Bacillus sp. SMIA-2.	19
Tabela 2 - Compostos utilizados para teste de compatibilidade enzimática em concentrações de 0,15 a 0,75%, p/v.	29
Tabela 3 - Níveis do planejamento fatorial do DCCR do tipo 2 ³ , com os valores das variáveis testadas, para o primeiro planejamento fatorial.	31
Tabela 4 - Níveis do planejamento fatorial do DCCR do tipo 2 ³ , com os valores das variáveis testadas, para o segundo planejamento fatorial.	32
Tabela 5 - Níveis do planejamento fatorial do DCCR do tipo 2 ³ , com os valores das variáveis testadas, para o terceiro planejamento fatorial.	32
Tabela 6 - Matriz do DCCR, do tipo 2 ³ para atividade enzimática de protease com os valores reais das variáveis independentes.	42
Tabela 7 - ANOVA para resposta da atividade de protease (U/mL) em diferentes concentrações de surfactante, temperaturas e intervalo de tempo.	43

Tabela 8 - Coeficiente de regressão dos valores de atividade da protease obtidos para as diferentes concentrações de surfactante, temperatura e tempo, conforme DCCR.	43
Tabela 9 - Matriz do DCCR, do tipo 2^3 para atividade enzimática de protease com os valores reais das variáveis independentes.....	47
Tabela 10 - ANOVA para resposta da atividade de protease (U/mL) em diferentes concentrações de oxidante, temperaturas e intervalos de tempo.	48
Tabela 11 - Coeficiente de regressão dos valores da atividade enzimática de protease, obtidos para diferentes concentrações de oxidante, temperatura e tempo, conforme DCCR.	48
Tabela 12 - Matriz do DCCR, do tipo 2^3 para atividade enzimática de protease com os valores reais das variáveis independentes.....	53
Tabela 13 - ANOVA para resposta da atividade de protease (U/mL) em diferentes concentrações de surfactante, oxidante e tempo.	54
Tabela 14 - Coeficiente de regressão dos valores da atividade enzimática de protease, obtidos para diferentes concentrações de surfactante e oxidante e em diferentes intervalos de tempo, conforme DCCR.	54

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema geral de produção das proteases por *Bacillus* sp. SMIA-2.....27
- Figura 2** - Procedimento utilizado para recuperação e purificação parcial das proteases secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2.....28
- Figura 3** - Compatibilidade de protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 com surfactante em diferentes concentrações. O controle, a enzima na ausência de surfactante foi considerada como 100% (=10,45 U/mL).....35
- Figura 4** - Compatibilidade de protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 com oxidantes em diferentes concentrações. O controle, a enzima na ausência de surfactante foi considerada como 100% (=10,45 U/mL).....36
- Figura 5** - Compatibilidade de protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 com *builders* em diferentes concentrações. O controle, a enzima na ausência de surfactante, foi considerada como 100% (=10,45 U/mL).....37
- Figura 6** - Estabilidade de protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 com surfactante (LAS) em diferentes concentrações.38
- Figura 7** - Estabilidade de protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 com oxidante (H₂O₂) em diferentes concentrações.39

Figura 8 - Estabilidade de protease secretada por <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 com <i>builders</i> (Na_2CO_3) em diferentes concentrações.	40
Figura 9 - Superfície de resposta 3D. Efeitos da concentração de surfactante e temperatura na atividade enzimática de protease (U/mL).	44
Figura 10 - Superfície de resposta 3D. Efeitos da concentração de surfactante e tempo na atividade enzimática de protease (U/mL).	45
Figura 11 - Superfície de resposta 3D. Efeitos da temperatura e tempo na atividade enzimática de protease (U/mL).	46
Figura 12 - Superfície de resposta 3D. Efeitos da concentração de oxidante e temperatura na atividade enzimática de protease (U/mL).	50
Figura 13 - Superfície de resposta 3D. Efeitos da concentração de oxidante e do tempo de exposição na atividade enzimática de protease (U/mL).	51
Figura 14 - Superfície de resposta 3D. Efeitos da temperatura e do tempo de exposição na atividade enzimática de protease (U/mL).	52
Figura 15 - Superfície de resposta 3D. Efeitos das concentrações de surfactante e concentrações de oxidante na atividade enzimática de protease (U/mL).	55
Figura 16 - Superfície de resposta 3D. Efeitos da concentração de surfactante e do tempo de exposição na atividade enzimática de protease (U/mL).	56
Figura 17 - Superfície de resposta 3D. Efeitos da concentração de oxidante e do tempo de exposição na atividade enzimática de protease (U/mL).	57
Figura 18 - Parâmetros "L" observados utilizando uma solução de limpeza proposta e detergentes comerciais em 0,7% (m/v).	58
Figura 19 - Parâmetros Chroma observados utilizando uma solução de limpeza proposta e detergentes comerciais em 0,7% (m/v).	59

RESUMO

FERREIRA, Larissa Pacheco; M. Sc. Produção Vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Agosto de 2018. FORMULAÇÃO DE UMA SOLUÇÃO DE LIMPEZA CONTENDO PROTEASES DE *Bacillus* sp. SMIA-2. Orientadora: Prof^a Meire Lelis Leal Martins.

A utilização de enzimas nas formulações de detergentes é crescente, visto que elas podem diminuir ou até substituir as concentrações de compostos utilizados nessas formulações, tornando a nova formulação mais sustentável. As proteases são as enzimas mais utilizadas nessa indústria, mas para este fim precisam obedecer a alguns critérios, como compatibilidade e estabilidade aos produtos presentes na formulação. Diversos compostos químicos são utilizados na formulação de detergentes, dentre os quais se destacam os surfactantes, oxidantes e builders. Um dos surfactantes mais utilizados por essa indústria é o LAS (Alquilbenzeno Sulfato Linear), um surfactante sintético com elevada taxa de toxicidade ao meio ambiente. Compostos oxidantes e “builders” como o peróxido de hidrogênio e o carbonato de sódio, auxiliam na remoção da sujeira, restaurando a cor branca e impedindo a redeposição da sujeira nos tecidos, respectivamente. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi estudar a compatibilidade e estabilidade de proteases de *Bacillus* sp SMIA-2 com alguns agentes surfactantes, oxidantes e builders para, posteriormente, utilizando o delineamento composto central rotacional (DCCR), do tipo 2³, otimizar as concentrações destes componentes, visando o desenvolvimento

de soluções de limpeza. Além disso, a eficácia dessas soluções na remoção de sujidades de sangue de tecidos padrões foi avaliada. O estudo demonstrou que a protease do *Bacillus* sp. SMIA-2 apresentou compatibilidade com o oxidante peróxido de hidrogênio e com o “builders” carbonato de sódio e alta compatibilidade com o surfactante LAS. Os resultados obtidos através do planejamento experimental demonstraram que o tempo não foi um fator limitante para a ação da protease e que sua atividade foi estimulada com maiores concentrações de LAS. Além disso, a enzima pode ser utilizada em diferentes faixas de temperatura, desde que ajustada às concentrações de surfactante e oxidante. A partir dos estudos de otimização uma formulação foi selecionada e posteriormente utilizada para avaliar o seu desempenho na remoção de sujidades de sangue de tecidos padrões. A eficácia da solução foi similar aos detergentes Brilhante e Invicto e menor que o detergente OMO®.

Palavras-chave: Surfactantes; Oxidantes; Detergente enzimático.

ABSTRACT

FERREIRA, Larissa Pacheco; M. Sc. Vegetables production. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. August 2018. FORMULATION OF A CLEANING SOLUTION CONTAINING PROTEASES OF *Bacillus* sp. SMIA-2. Advisor: Ph. D. Meire Lelis Leal Martins.

The use of enzymes in detergent formulations is increasing, as they are reduced or decreased according to their formulations, becoming a new, more sustainable formulation. Proteases are like the most important enzymes in the industry, but to this end are more important, more important and more important are present in the formulation. Several chemical compounds are used in the formulation of detergents, among which the surfactants, oxidants and builders stand out. One of the surfactants most used by this industry is the LAS (Linear Alkylbenzene Sulphate), a synthetic surfactant with high toxicity to the environment. Oxidizing compounds and builders such as hydrogen peroxide and sodium carbonate assist in the removal of dirt, restoring the white color and preventing redeposition of the tissues in the tissues, respectively. In view of the above, the work was studied and the stability of proteases of *Bacillus* sp SMIA-2 with some surfactants, oxidants and builders and then using the central composite design (CCD), type 2³, optimization as by these components, aiming the development of cleaning solutions. In addition, a bank of sample blood sampling solutions was evaluated. The study demonstrated that a *Bacillus* sp. SMIA-2 came up with the hydrogen peroxide oxidizer and the sodium carbonate builder and high affinity

with the surfactant LAS. The results obtained experimentally demonstrated that the time was not a limiting factor for the action of the protease and that its activity was estimated with the highest concentrations of LAS. In addition, the enzyme can be edited at different temperature ranges, as long as adjusted to the concentrations of surfactant and oxidant. From the results of a questionnaire was published and published to assess its performance in removing blood bags from tissue patterns. The efficiency of the solution was similar to Brilhante and Invicto detergent and lower than OMO® detergent.

Keywords: Surfactants, Oxidants, Enzymatic detergent.

1. INTRODUÇÃO

A necessidade de desenvolver produtos sustentáveis em função de pressões legais e de mercado levou as empresas de detergentes a adotarem a sustentabilidade como uma estratégia competitiva, que traz benefícios econômicos e promove a melhoria da imagem corporativa (Kara et al. 2005). Diante desta realidade, a demanda por enzimas para utilização em formulações de detergentes é crescente, uma vez que são surfactantes naturais capazes de aumentar o desempenho de lavagem e diminuir o impacto ambiental. Isso porque seu uso pode substituir parcialmente surfactantes, *builders* e outros agentes auxiliares (polímeros e agentes branqueadores/abrilhantadores) ou totalmente os agentes auxiliares, ou ainda permite a mudança para detergentes livres de fosfatos (Luz, 2007).

As enzimas são proteínas que agem como catalizadores, aumentando a velocidade das reações químicas (Smith, et al. 2007). São obtidas de fontes renováveis, são biodegradáveis e não oferecem riscos à vida marinha (Rodríguez et al. 2006). Assim, viabilizam negócios mais sustentáveis e ambientalmente corretos.

Ray (2012), afirma que o mercado de enzimas cresceu cerca de 10 vezes nos últimos 20 anos. Lima et al. (2001) indicam que somente 1% das enzimas identificadas são comercializadas. Industrialmente, as principais enzimas utilizadas são as amilases, a glicose isomerase e as proteases. Em 2010, a indústria de detergentes obteve 34% do total de venda de proteases, movimentando mundialmente cerca de 600 milhões de dólares (Santos, 2014). E, cerca de 25% do total de vendas mundial de enzimas são de proteases para uso em detergentes de roupas (Demain; Adrio, 2008).

As proteases alcalinas são muito utilizadas na indústria de detergentes, totalizando 35% do total de vendas de enzimas microbianas (Hadj-Ali *et al.*, 2007) e 89% do total de proteases comercializadas. As proteases alcalinas são usadas como aditivos nos detergentes para degradação de compostos tipicamente proteínáceos como sangue, manchas de ovos e leite (Sellami-Kamoun *et al.*, 2006).

Pesquisas realizadas no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Norte Fluminense - Campos dos Goytacazes, RJ, revelaram que a bactéria *Bacillus* sp SMIA-2 produz níveis satisfatórios de várias enzimas hidrolíticas, incluindo proteases (Ladeira *et al.* 2010; Ladeira *et al.* 2012; Barbosa *et al.* 2014), quando cultivada em culturas submersas contendo substratos de baixo custo, abrindo novas perspectivas para utilização desta cepa para a produção de enzimas em escala industrial. A boa atividade apresentada pelas proteases em valores de pH alcalinos, boa estabilidade e atividade enzimática a temperaturas relativamente elevadas, compatibilidade com compostos utilizados em formulações de detergentes, tais como, surfactantes e oxidantes, e a eficácia na remoção de manchas de tecidos de roupas, indicaram a possibilidade de aplicação destas enzimas em formulações de detergentes (Rodrigues, 2012).

Diante do exposto, a finalidade deste trabalho foi estudar a atividade e estabilidade de proteases secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2, na presença de diferentes surfactantes, oxidantes e *builders*. O efeito das concentrações destes dois componentes, do tempo de incubação e suas interações com a estabilidade da enzima foi estudada através do delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo 2³. Por fim, a eficiência de uma solução selecionada a partir destes estudos, contendo surfactante, oxidante, *builders* e proteases de *Bacillus* sp. SMIA-2, na remoção de sujidades de sangue de tecidos foi também avaliada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Enzimas em formulações de detergentes

A fermentação industrial é o cultivo em larga escala de células ou microrganismos para produção de substâncias com valor comercial. Nesse sentido, o cultivo de microrganismos para obtenção de enzimas livres, a fim de fabricar diversos produtos alimentícios, de papel e têxtil, vem aumentando. Esse aumento na produção de enzimas é alto por se tratar de produtos de alta especificidade, além de não gerarem resíduos, caros ou tóxicos, também são biodegradáveis (Tortora et al. 2012).

A utilização de enzimas pode permitir a síntese apenas de um produto específico, porque elas possuem uma determinada especificidade, tanto por um dado substrato, quanto na formação de apenas uma reação química, sem que haja a síntese de coprodutos. Além dessa alta especificidade, elas aceleram reações termodinamicamente favoráveis e seu uso reduz problemas ambientais e toxicológicos (Coelho et al. 2008).

Além disso, nos processos biotecnológicos industriais, as enzimas estão relacionadas à melhoria de processos, possibilitando a utilização de novas matérias-primas, aperfeiçoando suas propriedades físico-químicas e de diversos produtos (Lima et al. 2001).

A utilização de enzimas, como matérias-primas, em formulações de detergentes teve início na década de 70. Essa modificação foi crucial para acompanhar o aumento da demanda de fabricação, visto que as gorduras, utilizadas

inicialmente no processo de fabricação dos detergentes, se tornaram mais escassas e eram destinadas à alimentação (Lima et al. 2001).

Na fabricação de detergentes, são combinadas matérias-primas de acordo com a finalidade do produto e da relação custo/benefício. Desses componentes, encontram: surfactantes, agentes branqueadores, reguladores de espuma e viscosidade, brilhantadores ópticos, agentes alcalinizantes, inibidores de corrosão, enzimas, além de compostos auxiliares como amaciantes, perfumes e corantes (Luz, 2007; Jurado et al. 2007).

As enzimas podem substituir ou diminuir os níveis de surfactantes utilizados nas formulações de detergentes _ pequenas quantidades podem substituir grandes quantidades de químicos, tais como os surfactantes e oxidantes. Além de trazer maior poder de limpeza aos detergentes, já que os tensoativos não conseguem emulsionar (solubilizar) eficazmente a matéria orgânica, as enzimas contribuem de forma positiva para a questão da sustentabilidade (Rodríguez et al. 2006).

Na formulação dos detergentes, as enzimas devem ter algumas características específicas, a fim de tornar o processo viável. Devem manter estabilidade e atividade em pH alcalino, em altas temperaturas (acima de 40°C), devem ser compatíveis com surfactantes, amaciantes, perfumes, entre outros compostos presentes na formulação do produto, devem permanecer estáveis por longos períodos, devido ao tempo de armazenamento do produto e o processo de lavagem do material, ser possível a produção em larga escala, além de apresentarem alta especificidade para clivagem de diversas substâncias, como proteínas, carboidratos e celulose, por exemplo (Joo; Chang, 2005; Sellami-Kamoun et al., 2008).

2.1.1. Proteases

As proteases são enzimas que clivam ligações entre os aminoácidos das proteínas. Esse processo é comum na ativação ou inativação de enzimas e é denominado clivagem proteolítica. São classificadas como hidrolases, pois adicionam uma molécula de água à molécula clivada (Berg et al., 2004).

Podem ser classificadas de acordo com o tipo de reação catalisada, a natureza química do sítio catalítico e de acordo com sua estrutura. As endopeptidases

(EC 3.4.21-99), clivam proteínas longe das extremidades amino- e carboxi-terminal, gerando peptídeos maiores (proteinases) e são divididas em: serina-, cisteína-, aspártico-, metalo- e treonina-endopeptidases. As exopeptidases (EC 3.4.11-19) clivam proteínas na porção terminal, sendo as aminopeptidases as que clivam na porção amino-terminal e as carboxipeptidases as que clivam na porção carboxi-terminal. As carboxipeptidases podem ainda ser divididas em serina-, metalo- e cisteína-carboxipeptidases, gerando pequenos peptídeos ou mesmo aminoácidos (peptidases) (Gentil, 2014; Luz, 2007).

As proteases também podem ser classificadas de acordo com seu pH ótimo, podendo ser: ácidas (pH de 2,0 a 6,0), alcalinas (pH de 8,0 a 13,0) e neutras (pH 6,0 a 8,0) (Fellows, 2006). Na indústria de detergentes, as proteases alcalinas são importantes, pois apresentam alta atividade proteolítica e estabilidade quando submetidas às condições alcalinas, visto que o pH de detergentes está geralmente na escala de 8.0-12.0 (Deng et al. 2010; Maurer, 2004). Cerca de 25% do total de vendas mundial de enzimas são de proteases para uso em detergentes de roupas (Demain; Adrio, 2008).

Dois pesquisadores alemães, Rohm e Haas, utilizaram proteases obtidas de pâncreas de animais para criar o primeiro detergente com concentração enzimática (Burnus®), em 1914 (Gupta *et al.*, 2002). O primeiro detergente patenteado a utilizar protease foi depositado por Protect & Gamble em 1966 e trazia 0,005% a 4% de composição de protease (Souza et al. 2017).

Todas as proteases aplicadas na indústria de detergentes são serino-proteases produzidas por *Bacillus* sp. A Tabela 1 mostra as condições de atuação de algumas proteases disponíveis no mercado (Novo Nordisk S/A, Bagsvaerd, Denmark) e das serino-proteases produzidas pela cepa *Bacillus* sp SMIA-2 (Rodrigues et al. 2013; Gentil, 2014), que serão utilizadas neste trabalho.

Tabela 1 - Temperatura e pH de atuação de algumas proteases disponíveis no mercado (Novo Nordisk S/A, Bagsvaerd, Denmark) e das proteases produzidas pela cepa *Bacillus* sp. SMIA-2

	Microrganismo	Temperatura de atuação (°C)	pH de atuação
Protease	<i>Bacillus</i> sp SMIA-2	30-70	7-10
Alcalase®	<i>Bacillus</i> spp.	10-80	6-10
Esperase®	<i>Bacillus</i> spp.	10-80	7-12
Savinase®	<i>Bacillus</i> OGM	15-75	8-11
Durazym®	<i>Bacillus</i> OGM	15-70	8-11
Protamex™	<i>Bacillus</i> spp.	10-65	6-8

Souza, et al. (2017), ao analisar uma plataforma global de busca de patentes, observaram 919 documentos depositados relacionados à utilização de proteases em detergentes e composição de limpeza. Observou-se ainda que a aplicação dessas proteases para este fim é dominada pelos Estados Unidos, Japão e China. No Brasil foram encontrados 141 depósitos de patentes, totalizando cerca de 15% do total de patentes onde se utiliza protease em detergentes e produtos de limpeza.

2.2. Coadjuvantes de Limpeza

Os sabões são usados há séculos por serem feitos de materiais naturais, como gorduras animais e soda cáustica. Entre as décadas de 40 e 60, a demanda na fabricação de sabão teve um aumento de 80%. Já na década de 70, mais de 80% de toda produção era preparada com matérias-primas novas (Lima et al. 2001). Atualmente, os surfactantes sintéticos são os tensoativos de escolha para quase todos os agentes de limpeza (Essential Industries, 2017).

Em uma formulação de detergente moderna, podemos encontrar 20 ou mais ingredientes, dependendo da função a ser desempenhada pelo produto. Substâncias como surfactantes, oxidantes, *builders*, enzimas, controladores de espuma, perfumes, corantes e diversos outros componentes, são adicionadas. Essas substâncias são adicionadas em uma proporção onde mantém suas propriedades físicas e sua estabilidade, além de serem combinadas para obter melhor custo benefício para ser produzida em escala industrial (Luz, 2007).

2.2.1. Surfactantes

Surfactante é uma abreviação de “*surface active agent*”, termo que significa, literalmente, agente de atividade superficial. Outro termo em português que designa o mesmo tipo de substância é tensoativo. São utilizados em larga escala por diversos setores industriais além da indústria de detergentes, tais como a indústria têxtil, alimentar, de tintas, e na biotecnologia, como auxiliares de biocatálise e de métodos bioquímicos de análise e purificação (Martins, 2009).

São moléculas constituídas por uma porção hidrofóbica, formada por cadeias hidrocarbonadas, que é atraída por óleos e sujidades, e outra porção hidrofílica, que pode ser uma porção não-iônica, aniônica, catiônica ou anfotérica, que é atraída pela água. Sendo assim, são classificados de acordo com a carga da porção hidrofílica em: não-iônicos, aniônicos, catiônicos e anfóteros. Independentemente de sua classificação, todos têm uma semelhança, eles tendem a se distribuírem nas interfaces de acordo com o grau de polaridade e isto reduz a tensão superficial e interfacial (Penteado et al. 2006; Nitschke; Pastore, 2002).

Outra característica fundamental é a formação de agregados denominados micelas. A concentração mínima para que isto ocorra chama-se Concentração Micelar Crítica (CMC). A partir dessa concentração, ocorre a formação de agregados, onde a porção hidrofóbica da molécula se posiciona para o interior do agregado, enquanto a porção hidrofílica permanece no exterior. Abaixo da CMC, o surfactante encontra-se na forma de monômeros. Ao se aproximar da CMC, já ocorre um equilíbrio entre monômeros e micelas e em concentrações superiores a CMC o diâmetro das micelas aumenta (3-6 nm), sendo estas formadas por 30 a 200 monômeros. A CMC depende da estrutura do surfactante, do tamanho de sua cadeia do hidrocarboneto e de condições experimentais (força iônica, temperatura, etc.) (Barros, et al. 2007; Behring et al. 2004; Maniasso, 2001). Suas propriedades fazem com que sejam aplicados amplamente na indústria como agentes detergentes, emulsificantes, lubrificantes, espumantes, molhantes, solubilizante e de dispersor de fases (Penteado et al. 2006; Nitschke; Pastore, 2002).

Os surfactantes classificados como não iônicos possuem seu componente hidrofílico não ionizado e apresentam valores de CMC menores, em comparação com surfactantes aniônicos. São utilizados em cosméticos, defensivos agrícolas, no

tratamento de metais, na indústria têxtil e de petróleo. Tem como exemplo o Renex e o Triton (Luz, 2007; Maniasso, 2001; Preté, 2006).

Os surfactantes catiônicos possuem moléculas carregadas positivamente na sua porção hidrofílica, são aminas primárias, secundárias e terciárias e os sais de amônio quaternário. São utilizados na indústria têxtil, no revestimento de estradas, no amaciante de roupas e condicionadores de cabelo. Tem como exemplo o brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB) e o brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB) (Luz, 2007; Maniasso, 2001; Preté, 2006).

Os surfactantes anfóteros possuem componentes catiônico e aniônico, em sua porção hidrofílica, são suaves e compatíveis com enzimas, mas apresentam alto custo. São utilizados em produtos de higiene pessoal, a indústria de automóveis e limpeza industrial. Tem como exemplo as betaínas (Luz, 2007; Preté, 2006).

Os surfactantes aniônicos apresentam em sua cadeia hidrofílica componentes aniônicos, normalmente sulfato, sulfonato e carboxilato (Showell, 2006) e funcionam muito bem em pH alcalino (entre 9 e 11) (Novozymes, 2002). São muito utilizados na indústria de detergentes de uso doméstico, lavanderias, indústrias têxtil e de papel. Tem como exemplo o dodecil sulfato de sódio (SDS) e o alquil benzeno sulfonato linear (LAS) (Preté, 2006).

O alquilbenzeno sulfonato (ABS), principal surfactante aniônico sintético, surgiu na década de 40 a partir de precursores derivados do petróleo (Nitschke; Pastore, 2002). Ele foi produzido e consumido mundialmente em larga escala devido ao seu baixo custo de produção e melhor desempenho quando comparado ao sabão. Esse grande consumo levou a sérios problemas nas estações de tratamento de esgoto, pela formação de camadas densas de espuma. Isso porque as espumas dificultam o processo de aeração dos tanques de tratamento, além de arrastarem poluentes e microrganismos por longas distâncias. Após essas evidências, constatou-se que a presença de carbonos quaternários na sua cadeia hidrofóbica fazia com que o ABS fosse resistente a biodegradação, o que levou a sua substituição em vários países por surfactantes biodegradáveis, ou seja, com cadeias alquílicas lineares (Penteado et al. 2006).

Os surfactantes aniônicos mais usados na formulação de produtos de limpeza são o alquil benzeno sulfonato linear (LAS) e álcoois graxos (AG) etoxilados e sulfatados devido ao seu baixo custo (Martín; Martínéz, 2013; Penteado et al. 2006).

Desde o seu desenvolvimento nos anos 60, o LAS tem sido um excelente surfactante aniônico obtido sinteticamente, além de barato e fundamental para detergência. Porém, é biodegradável somente em condições aeróbicas. Nas últimas décadas, os órgãos governamentais de proteção ambiental vêm se preocupando com os níveis de LAS encontrados no meio hídrico. Prioritário na lista de compostos prejudiciais, o LAS possui elevada taxa de toxicidade. Quanto maior a cadeia de hidrocarbonetos, maior a toxicidade (Penteado et al. 2006).

Os Alquil sulfatos podem ser obtidos por via natural (palmeiras, coqueiros, sebo de animais) ou sintética. Utilizados para diminuir a dureza da água impedindo a precipitação de sais de cálcio insolúveis, mas altamente espumantes (Biermann et al. 1987).

Os Álcoois etoxilados (AE), por serem surfactantes não-iônicos (sem cargas elétricas), são resistentes à dureza da água e excelentes desengordurantes. São responsáveis também pela reação de impedimento estérico que evita a redeposição de sujeira nos tecidos durante a lavagem. São considerados baixos ou moderados geradores de espuma (Essential Industries, 2017).

A procura por surfactantes naturais vem ao encontro da pressão por uso de produtos mais ecológicos e novas legislações. No Brasil, o decreto nº79094 de 1977 proíbe a fabricação, comercialização ou importação de tensoativo aniônico não biodegradável (Brasil, 1977; Nitschke; Pastore, 2002).

Em detergentes domésticos, o surfactante talvez seja o ingrediente mais importante, abrangendo entre 15% e 40% do total de uma formulação (Yangxin et al. 2008). Porém, a indústria não utiliza somente um tipo de surfactante específico, mas sim uma mistura das diferentes categorias para reforçar a sua capacidade de desempenho, melhores propriedades anti-redeposição, tolerância à dureza da água e para diminuir a agressividade à pele das mãos, quando lavadas manualmente (Yangxin et al. 2008).

Algumas bactérias, fungos e leveduras são capazes de produzir surfactantes naturais, os chamados biossurfactantes. São classificados como: (1) glicolipídeos; (2) lipopeptídeos e lipoproteínas; (3) lipopolissacarídeos; (4) fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros; (5) surfactantes poliméricos e (6) surfactantes Particulados (Zajic; Sefens, 1984; Desai; Banat, 1997; Bugay, 2012).

Os biossurfactantes mais frequentemente produzidos por microrganismos são os glicolípidos. Os substratos mais usados para a sua produção têm sido os hidrocarbonetos, pelo seu preço, e óleos vegetais para efeitos de investigação científica. Entretanto, a produção destes surfactantes não é ainda economicamente viável, quando comparada com seus equivalentes sintéticos (Mercade; Manresa, 1994).

No que diz respeito à produção de biossurfactantes por *Bacillus sp.*, a produção de enzimas se concentra em sua maior parte na classe de lipopeptídeos e lipoproteínas. Um exemplo disto são as espécies *B. licheniformis*, *B. brevis*, *B. polymyxa* e *B. subtilis*. Estas sintetizam, por exemplo, surfactina, subtilisina, gramicidina e polimixina (Desai; Banat, 1997; Nistschke; Pastore, 2002).

Os biossurfactantes são facilmente degradáveis na água e no solo e diminuem a preocupação com alergias devido a produtos artificiais. Seu uso é descrito em diversos setores, como o de limpeza, na mineração, na recuperação melhorada do petróleo. Além disso, sua baixa toxicidade permite que sejam empregados em alimentos, cosméticos e medicamentos (Nistschke; Pastore, 2002).

2.2.2. Oxidantes e *builders*

Além dos surfactantes, outras substâncias como alvejantes, *builders* e enzimas, são adicionadas a formulações de detergentes a fim de auxiliar na remoção da sujeira.

Os agentes oxidantes são compostos que sofrem redução, ocasionando oxidação de substâncias químicas que reagem com eles. Um oxidante comum no uso doméstico são os alvejantes, que possuem a capacidade de restaurar a cor branca do tecido tornando manchas mais solúveis ou alterando a capacidade de interação da mancha com a luz. São exemplos de alvejantes domésticos: hipoclorito de sódio (NaClO), perborato de sódio (NaBO₃)H₂O mono-hidratado (PBS-1) ou tetra-hidratado (PBS-4), percarbonato de sódio (2Na₂CO₃.3H₂O₂) e o primeiro alvejante comercial, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Mendelson, 2010).

Os *builders* agem na água protegendo os surfactantes de metais como cálcio e magnésio. Isso porque alguns metais dissolvidos na água se combinam com

surfactantes aniônicos formando a espuma. Esse composto é pouco solúvel e reduz a eficiência da lavagem, pois aumenta a dureza da água, diminui a concentração de surfactantes livres e torna os tecidos ásperos. Além disso, atuam como solução tampão, regulando o pH e impedindo a redeposição de sujeira (Brito, 2012). Entre os *builders* utilizados pela indústria encontram: ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), que também é excelente na remoção de cobre, zinco e ferro; o carbonato de sódio (Na_2CO_3), e o etileno diamino tetra acetato (EDTA) (Novozymes, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Otimizar soluções de limpeza contendo proteases de *Bacillus* sp SMIA-2 utilizando a metodologia de superfície de resposta.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar a compatibilidade e estabilidade de proteases na presença de diferentes concentrações de surfactantes, oxidantes e *builders*;
- Estudar o efeito da interação entre diferentes concentrações de surfactantes e oxidantes sobre a estabilidade de proteases de *Bacillus* sp SMIA-2, tempo de exposição e temperatura, utilizando o planejamento fatorial;
- Avaliar a eficiência de uma solução, selecionada a partir dos estudos de otimização, na remoção de sujidades de sangue em tecidos padrões

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção do extrato enzimático

O extrato enzimático liofilizado e parcialmente purificado que foi utilizado neste trabalho foi obtido por Rodrigues (2012). O esquema geral do processo de produção utilizado está na Figura 1. A metodologia que foi empregada para a recuperação e purificação parcial das enzimas está apresentada na Figura 2.

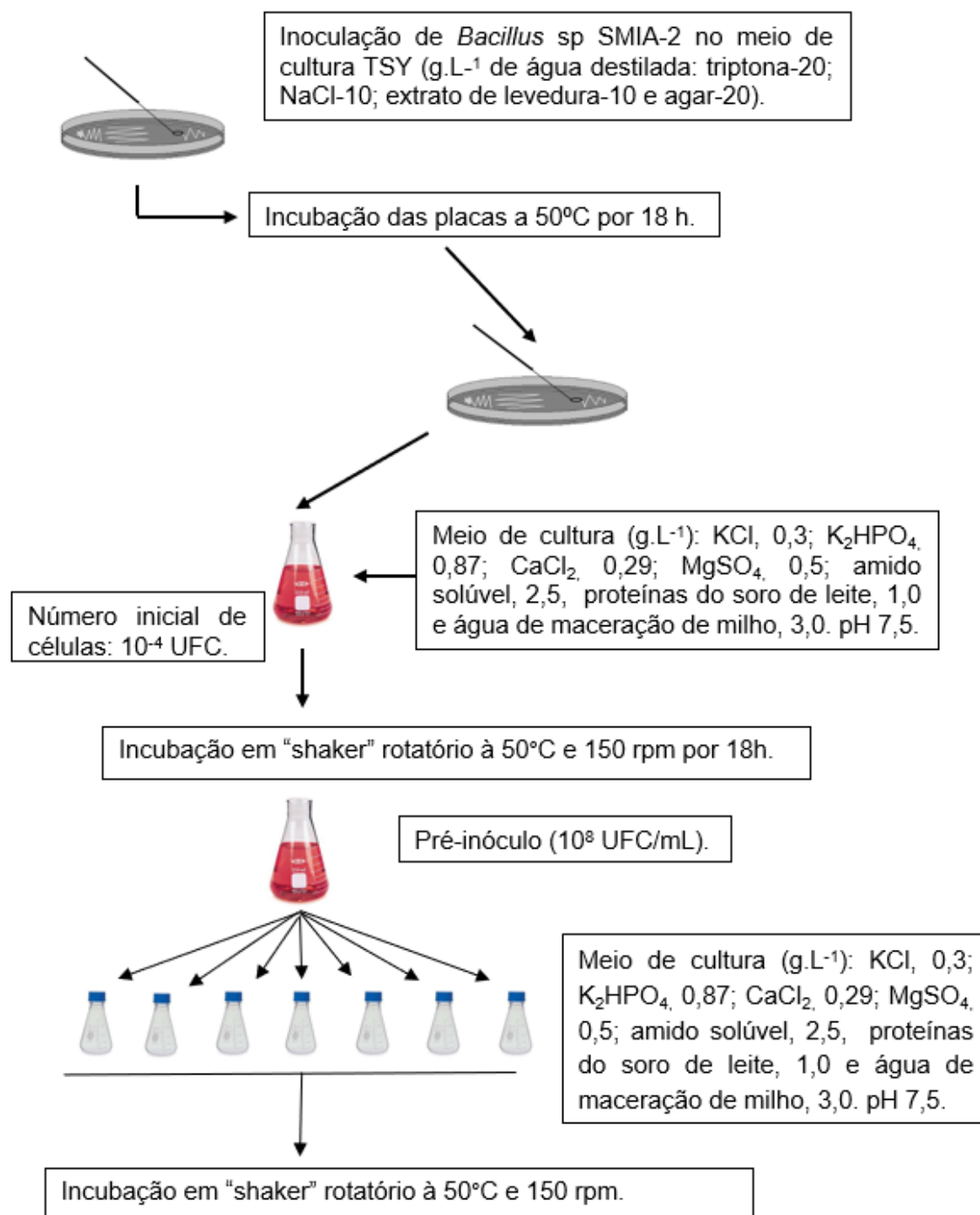


Figura 1 - Esquema geral de produção das proteases por *Bacillus* sp. SMIA-2.

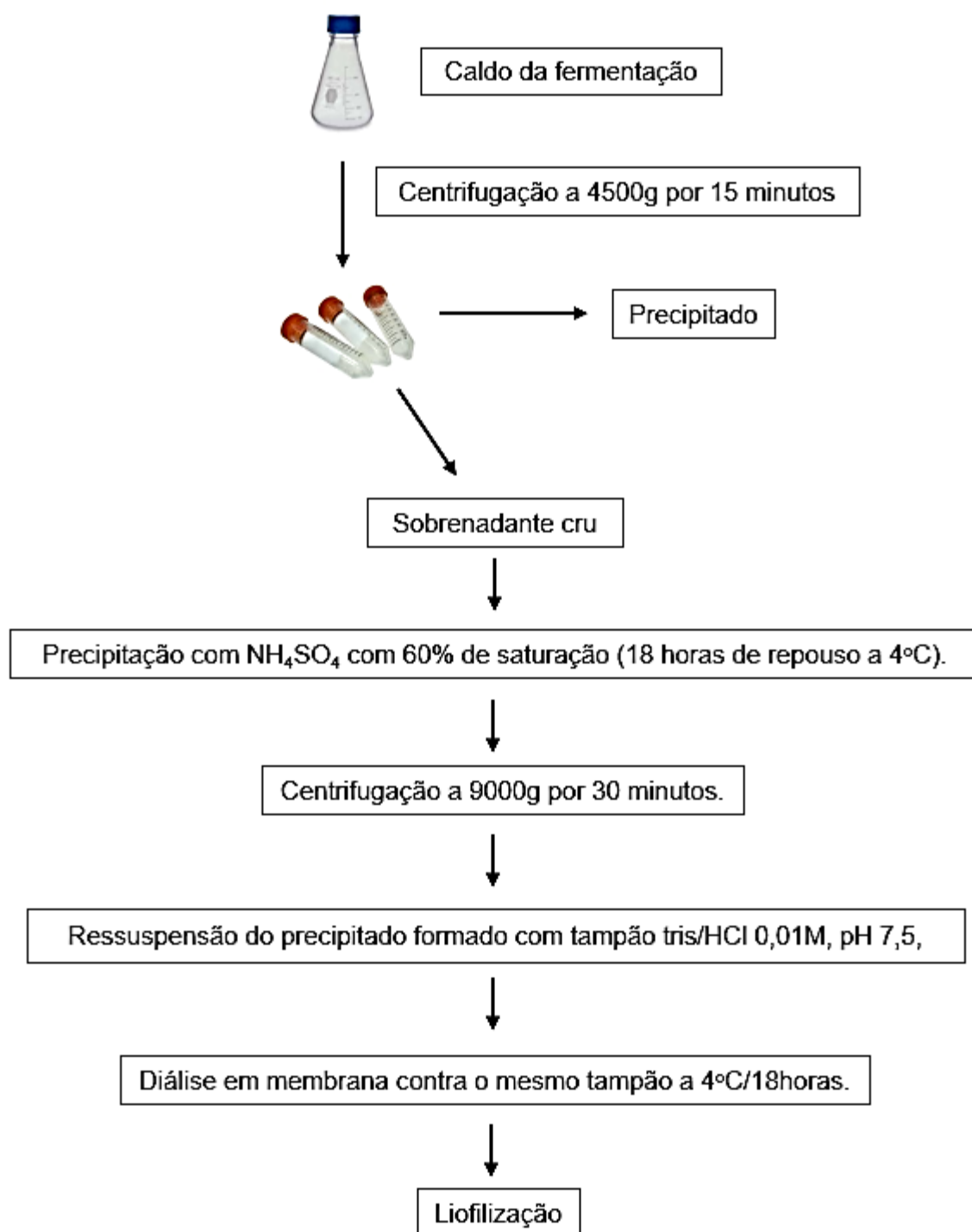


Figura 2 - Procedimento utilizado para recuperação e purificação parcial das proteases secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2.

4.2. Determinação da atividade de protease

O extrato enzimático parcialmente purificado e liofilizado foi diluído na concentração de $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ e utilizado para a dosagem da atividade da protease, que foi determinada em triplicata pela quantificação de peptídeos solúveis em ácido tricloroacético (TCA) 15% (Johnvesly; Naik, 2001).

Para análise das amostras foi adicionado, em Tubos Eppendorff, 1 mL de azocaseína 0,2% (p/v) em tampão Tris-HCl (0,05 M – pH 8,5) e 0,5 mL do extrato enzimático. Esse material foi incubado em banho-maria a 70°C por 10 minutos. Após, foi adicionado 0,5 mL de TCA 15% e centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi colocado em tubo de ensaio contendo 0,5 mL de NaOH (1M). A coloração desenvolvida foi medida em espectrofotômetro (SHIMADZU UV-mini 1240), onde a leitura de absorbância foi feita em 420nm (Janssen et al. 1994).

Em paralelo foi realizado um controle contendo todos os reagentes do ensaio anterior, porém, 0,5 mL do extrato enzimático foi adicionado após o TCA 15%.

Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento na absorbância a 420 nm igual a 1,0 em 60 minutos.

4.3. Compatibilidade da protease com componentes utilizados na formulação de detergentes

A compatibilidade das enzimas com surfactantes, oxidantes e *builders* foi estudada realizando os ensaios enzimáticos na presença dos compostos, de acordo com a tabela 2.

Tabela 2 - Compostos utilizados para teste de compatibilidade enzimática em concentrações de 0,15 a 0,75%, p/v

Surfactantes	Triton-X 100 (Vetec), Renex 60 (São Lázaro), Renex 95 (São Lázaro), LAS - dodecil benzeno sulfonato de sódio (Sigma-Aldrich).
Oxidantes	Peróxido de hidrogênio (Impex), Perborato de sódio (Impex).

Tabela 2, cont.;

<i>Builders</i>	Carbonato de sódio (Vetec), EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético (Merck).
-----------------	--

4.4. Estabilidade da protease com componentes utilizados na formulação de detergentes

A estabilidade da enzima na presença dos surfactantes, oxidantes e *builders* em que as enzimas apresentaram maiores atividades, no teste de compatibilidade, foi estudada incubando as mesmas na presença destes componentes à temperatura de 60°C a intervalos de tempo de 0, 15, 30, 60 e 120 min. Em seguida, a atividade residual das enzimas foi determinada conforme descrito previamente na secção 4.2. Um controle, considerado como 100%, foi feito incubando as enzimas na ausência destes compostos nas mesmas condições anteriormente mencionadas.

4.5. Planejamento fatorial fracionado

Três planejamentos fatoriais fracionados foram realizados para avaliar o efeito da concentração do surfactante, do oxidante, da temperatura e do tempo sobre a atividade da protease secretada por *Bacillus* sp SMIA-2. A enzima foi diluída em uma concentração para que a mesma apresentasse atividade de 14 U/mL.

4.5.1. Otimização da concentração de surfactante, temperatura e tempo de exposição

O primeiro planejamento visou otimizar a concentração do surfactante, a temperatura e o tempo de exposição enzimática. O surfactante selecionado neste estudo foi aquele em que a enzima apresentou maior compatibilidade e estabilidade (secção 4.4) _ LAS.

Foi utilizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo 2^3 com três repetições do ponto central e seis pontos axiais, totalizando 17 ensaios (Rodrigues; lemma, 2014).

As concentrações de LAS utilizadas, assim como as temperaturas e o tempo de exposição, podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3 - Níveis do planejamento fatorial do DCCR do tipo 2^3 , com os valores das variáveis testadas, para o primeiro planejamento fatorial

Variáveis		Níveis				
		-1,68	-1	0	1	1,68
Primeiro	LAS (%)	4	8,05	14	19,95	24
Planejamento	Temperatura	25	31,1	45	56,9	65
	Tempo (min)	240	702	1380	2058	2520

A análise estatística dos dados obtidos em cada planejamento fatorial foi submetida à análise de variância (ANOVA $p < 0,05$), seguindo o modelo de superfície de resposta utilizando o programa Statistica, versão 5.0. A resposta avaliada foi a atividade enzimática da protease (U/mL).

4.5.2. Otimização de concentração de oxidante, temperatura e tempo de exposição

O segundo planejamento visou otimizar a concentração do oxidante, a temperatura e o tempo de exposição enzimática. O oxidante selecionado neste estudo foi aquele em que a enzima apresentou maior compatibilidade e estabilidade (secção 4.4) _ Peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Foi utilizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo 2^3 com três repetições do ponto central e seis pontos axiais, totalizando 17 ensaios (Rodrigues; lemma, 2014).

As concentrações de peróxido de hidrogênio utilizadas, assim como as temperaturas e o tempo de exposição, podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4 - Níveis do planejamento fatorial do DCCR do tipo 2³, com os valores das variáveis testadas, para o segundo planejamento fatorial

	Variáveis	Níveis				
		-1,68	-1	0	1	1,68
Segundo	H ₂ O ₂ (%)	1	2,82	5,5	8,18	10
Planejamento	Temperatura	25	31,1	45	56,9	65
	Tempo (min)	240	702	1380	2058	2520

A análise estatística dos dados obtidos em cada planejamento fatorial foi submetida à análise de variância (ANOVA, $p < 0,1$), seguindo o modelo de superfície de resposta utilizando o programa Statistica, versão 5.0. A resposta avaliada foi a atividade enzimática da protease (U/mL).

4.5.3. Otimização da concentração de surfactante, concentração de oxidante e tempo de exposição

O terceiro planejamento visou otimizar a concentração do LAS, a concentração do peróxido de hidrogênio e o tempo de exposição enzimática, fixando a temperatura em 45°C (temperatura do ponto central nos planejamentos anteriores).

Foi utilizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo 2³ com três repetições do ponto central e seis pontos axiais, totalizando 17 ensaios (Rodrigues; lemma, 2014).

As concentrações de LAS, de peróxido de hidrogênio e o tempo utilizados foram os mesmos utilizados nos planejamentos anteriores, e podem ser observados na tabela 5.

Tabela 5 - Níveis do planejamento fatorial do DCCR do tipo 2³, com os valores das variáveis testadas, para o terceiro planejamento fatorial

	Variáveis	Níveis				
		-1,68	-1	0	1	1,68
Terceiro	LAS (%)	4	8,05	14	19,95	24
Planejamento	H ₂ O ₂ (%)	1	2,82	5,5	8,18	10
	Tempo (min)	240	702	1380	2058	2520

A análise estatística dos dados obtidos em cada planejamento fatorial foi submetida à análise de variância (ANOVA, $p < 0,1$), seguindo o modelo de superfície de resposta utilizando o programa Statistica, versão 5.0. A resposta avaliada foi a atividade enzimática da protease (U/mL).

4.5. Efeito do desempenho de Lavagem

A solução de limpeza selecionada foi o ensaio 10 do terceiro planejamento fatorial, onde contém (% p/v) 24 - LAS, 5,5 - H_2O_2 , 0,5 - Na_2CO_3 . Sua eficácia foi avaliada utilizando pequenos tecidos (4,5 cm x 4,5 cm) sujos com sangue padrões EMPA 111 (TEXCONTROL). A enzima foi adicionada as soluções numa concentração em que a atividade da mesma foi 12,45 U/mL.

Os tecidos foram submetidos à lavagem utilizando frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo a solução de limpeza selecionada, sob agitação de 150 rpm à temperatura de 45 °C por 30 min, em “shaker” rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA).

Além de testar a solução proposta, os detergentes comerciais Brilhante®, Invicto® e Omo® foram submetidos ao mesmo teste. A concentração utilizada em todos os testes foi de 0,7% (p/v).

A avaliação do poder de detergentia foi feita pela medida de cor dos tecidos utilizando o colorímetro de Hunter, Hunterlab Miniscan XE Plus (HUNTER LAB), escala CIELAB (L^* , a^* , b^*). Na escala de Hunter, o índice “L” mede a luminosidade variando de 0 (para amostra perfeitamente preta – mínima refletância) e 100 (para amostra perfeitamente branca – máxima refletância). O parâmetro “a” mede variações na faixa de cor verde (sinal negativo) ao vermelho (sinal positivo) e o parâmetro “b” mede variações na faixa de cor azul (sinal negativo) ao amarelo (sinal positivo). As medidas de cor foram expressas em termos de Parâmetro “L” e Chroma $(a^{*2}+b^{*2})^{1/2}$, que é definido como a intensidade de cor. Valores mais baixos do parâmetro Chroma indicam menos intensidade de cor. Portanto, esta escala permite uma comparação de valores de cor e foi usada para avaliar a eficiência das formulações na remoção das sujidades.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Compatibilidade de proteases com componentes utilizados na formulação de detergentes

A compatibilidade da protease com diferentes concentrações de surfactantes está demonstrada na Figura 3. A protease foi compatível com os surfactantes não-iônicos Renex 60, Renex 95 e Triton X-100 em todas as concentrações que foram testadas, provavelmente devido à maior acessibilidade ao substrato, visto que, segundo Maniasso (2001) e Preté (2006), os surfactantes não iônicos apresentam valores de CMC menores que os apresentados por surfactantes aniônicos, ou seja, formam as micelas com menores concentrações. Já para o LAS, um surfactante aniônico, foi observado que quando baixas concentrações foram utilizadas a atividade da protease foi inibida, mas à medida que a concentração deste surfactante foi aumentando, a atividade da protease aumentou e atingiu seu valor máximo com uma concentração de 0,75%. Esse valor foi em torno de 40% maior que o controle (enzima sem a presença de qualquer surfactante).

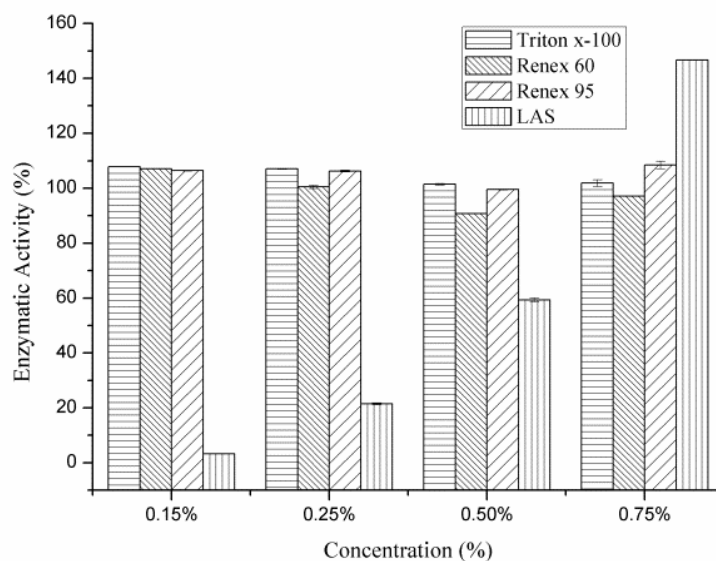


Figura 3 - Compatibilidade de protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 com surfactante em diferentes concentrações. O controle, a enzima na ausência de surfactante foi considerada como 100% (=10,45 U/mL).

Os surfactantes não-iônicos e os aniônicos são utilizados como agentes estabilizadores em formulações comerciais de enzimas. Dependendo da concentração, facilitam a reatividade da enzima por aumentar a solubilidade dos componentes da reação (Buxbaum, 2011). Na presença de 0,1% de Triton X-100, a protease de *Aspergillus fumigatus Fresenius*, apresentou atividade residual de 97% (Silva, 2011). Entretanto, alguns surfactantes podem agir como agentes desnaturantes promovendo o rompimento de ligações não covalentes (Berg et al. 2002). Portanto, diferentes surfactantes exibem diferentes efeitos dependendo da estrutura do surfactante e da proteína (enzima).

Os resultados da compatibilidade da protease com diferentes concentrações de oxidantes estão demonstrados na Figura 4. O peróxido de hidrogênio é conhecido por ser um forte agente oxidante e medeia a inativação oxidativa de proteínas. Assim, foi de interesse determinar a compatibilidade da protease de *Bacillus* sp SMIA-2 com soluções contendo perborato de sódio e peróxido de hidrogênio. Em concentrações mais baixas de peróxido de hidrogênio (0,15%), a atividade da enzima diminuiu. O aumento da concentração deste oxidante para 0,75% provocou um ligeiro estímulo na atividade da protease. Por outro lado, quando a enzima foi incubada na presença do

perborato de sódio, a sua atividade diminuiu à medida que a concentração desse oxidante aumentou (Figura 4).

Agentes oxidantes podem facilmente levar à oxidação de alguns aminoácidos e causar a inativação de enzimas. A maioria das proteases comerciais tem sido relatada como instável na presença de agentes de branqueamento (Gupta et al., 2002).

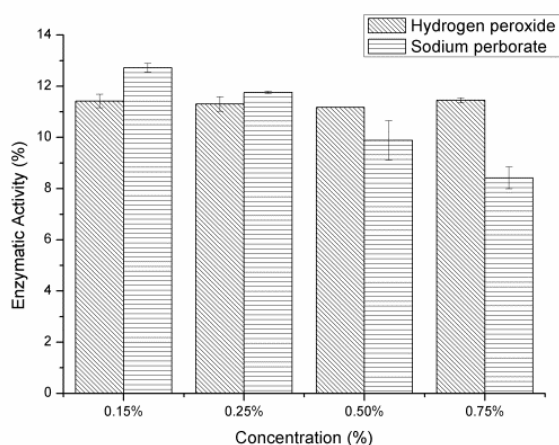


Figura 4 - Compatibilidade de protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 com oxidantes em diferentes concentrações. O controle, a enzima na ausência de surfactante foi considerada como 100% (=10,45 U/mL).

Outro importante adjuvante de detergente usado em aplicações de lavagem são os “builders”. Na presença de ambos os “builders” carbonato de sódio e EDTA, a atividade da protease diminuiu quando a concentração destes compostos foi aumentada de 0,15% para 0,75% no meio reacional. Ressalta-se que a protease apresentou maior atividade na presença do carbonato de sódio do que na presença do EDTA, para todas as concentrações utilizadas (Figura 5).

O EDTA é um inibidor de metalo-proteases e quelante de íons metálicos, tais como cálcio. Desta maneira, quando está presente no meio reacional o EDTA forma complexos muito estáveis com os íons metálicos, retirando-os do meio.

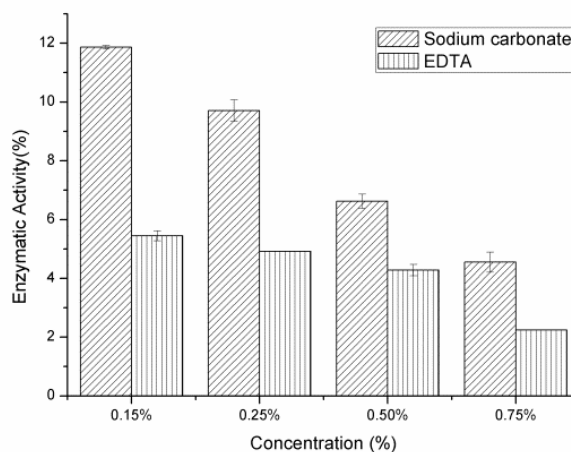


Figura 5 - Compatibilidade de protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 com *builders* em diferentes concentrações. O controle, a enzima na ausência de surfactante, foi considerado como 100% (=10,45 U/mL).

5.2. Estabilidade de proteases de *Bacillus* sp SMIA-2 com componentes utilizados na formulação de detergentes

A estabilidade da protease na presença de diferentes concentrações do surfactante LAS está mostrada na Figura 6. A enzima manteve 94% de sua atividade quando incubada a 60°C por 2 h na presença de 0,25% LAS. Com o aumento da concentração deste surfactante para 0,75%, a protease manteve em torno de 114% de sua atividade.

Os tensoativos aniônicos, incluindo alquilbenzeno sulfonato linear (LAS), são conhecidos por diminuir a estabilidade de proteases em detergentes, possivelmente pela aceleração de processos autoproteolíticos. Para evitar a desnaturação de proteases por surfactantes, certos sais (íons) e até mesmo outros surfactantes podem ser utilizados (Russell; Britton, 2002).

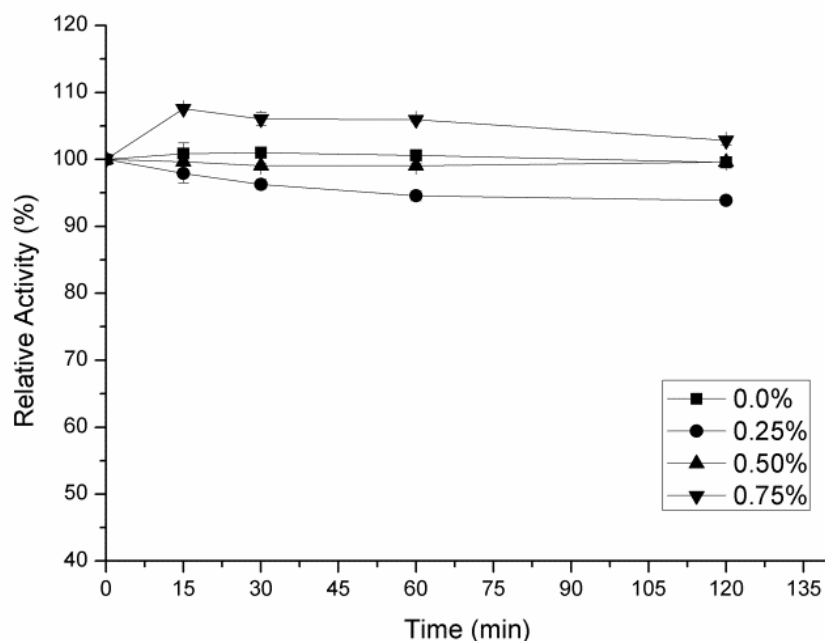


Figura 6 - Estabilidade de protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 com surfactante (LAS) em diferentes concentrações.

A estabilidade da protease na presença de diferentes concentrações do oxidante peróxido de hidrogênio está mostrada na Figura 7. Quando a enzima foi incubada com 0,5% e 0,75% de peróxido de hidrogênio a 60°C por 2 h a sua estabilidade foi aumentada em torno de 20%. Enzimas que apresentam extrema estabilidade em relação aos agentes oxidantes são de imenso significado comercial para a indústria de detergentes, porque os peróxidos e perboratos são ingredientes comuns das formulações modernas de detergentes à base de água sanitária.

Peróxido de hidrogênio e perborato de sódio, cada um a 1% de concentração, estimularam a atividade residual da protease alcalina de *Bacillus licheniformis* N-2 até 135 e 126%, respectivamente, enquanto 124% e 108% de aumento na atividade residual foram observados na concentração de 5% de H₂O₂ e perborato de sódio, respectivamente (Nadeem et al., 2008). A protease alcalina de *Bacillus clausii* I-52 exibiu atividade residual de até 114% após o tratamento com 1% de H₂O₂, enquanto uma protease alcalina da cepa *Vibrio fluvialis* VM10 mostrou atividade de 132% após a incubação com 4% de H₂O₂ (Çalik et al. 2002). No entanto, a protease *Bacillus* RP1 foi menos estável contra agentes oxidantes e reteve 68% e 48% de sua atividade após

1 h de incubação a 40 ° C na presença de 2% de H₂O₂ e 0,2% de perborato de sódio, respectivamente (Sellami-Kamoun et al. 2008).

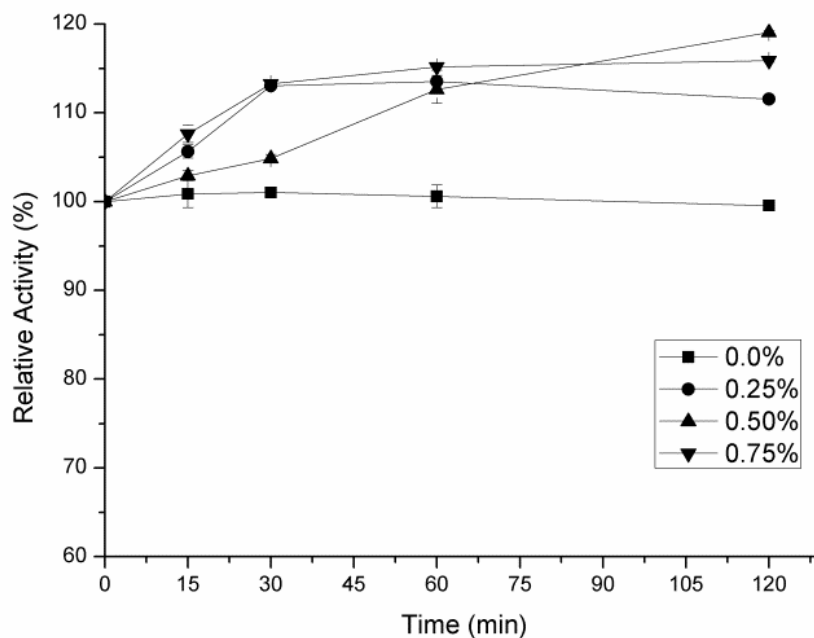


Figura 7 - Estabilidade de protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 com oxidante (H₂O₂) em diferentes concentrações.

Em relação à estabilidade da protease com o carbonato de sódio, foi mostrado que em concentração de 0,75%, a atividade residual não apresentou nenhuma alteração quando incubado a 60°C por 2 h. Em concentrações menores, houve uma ligeira queda na atividade nessas mesmas condições (aproximadamente 95% e 98% em concentrações de 0,25% e 0,50%, respectivamente) (Figura 8).

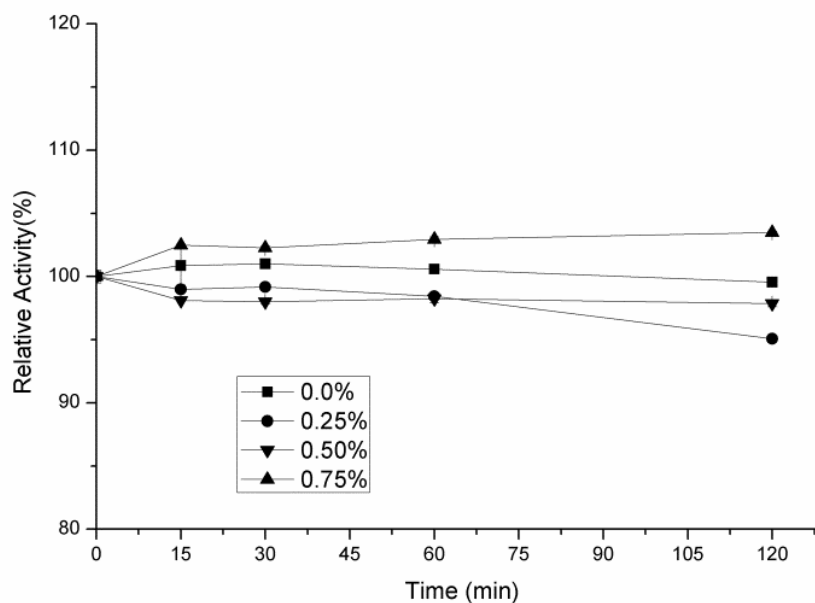


Figura 8 - Estabilidade de protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 com *builders* (Na_2CO_3) em diferentes concentrações.

5.3. Planejamento Fatorial Fracionado

O planejamento fatorial 2^3 utiliza 3 fatores analisados em 2 níveis. Esse planejamento é muito útil, a fim de investigar as variáveis de um trabalho experimental, sendo muito utilizado em experimentos de varredura de fatores. Em um planejamento fatorial, quando o número de fatores é grande, o número de experimentos necessários é muito elevado. Em contrapartida, utilizando o planejamento fatorial fracionado é possível selecionar quais fatores tem mais efeitos, detectando as variáveis independentes mais importantes e dando início a um novo planejamento considerando as variáveis com melhores efeitos, quando necessário, reduzindo o número de experimentos. A utilização de superfícies de resposta permite avaliar a influência de várias variáveis independentes a fim de otimizar essa resposta (Calado e Montgomery, 2003).

5.3.1. Otimização da concentração de surfactante, temperatura e tempo de exposição

O delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo 2^3 e posterior construção das superfícies de resposta foram utilizados para avaliar as concentrações de surfactante, a temperatura e o tempo em que o extrato enzimático foi exposto, a fim de avaliar qual a melhor condição para maior atividade enzimática de protease (U/mL).

Na Tabela 6 está exposta a Matriz do DCCR para atividade da protease (U/mL).

De acordo com a Tabela 6, a atividade de protease variou de 0,648 (ensaio 9) a 17,298 (ensaio 7). A maior atividade de protease foi observada utilizando uma concentração do LAS de 8,05 (p/v), temperatura de incubação de 56,9°C e 2058 minutos.

O LAS (alquilbenzeno sulfonato linear) é o surfactante mais amplamente utilizado em detergentes domésticos e industriais. Além da sua significativa presença em muitos detergentes domésticos (com concentração típica variando de 3 a 22%) e em produtos para todas as finalidades de limpeza, também é utilizado em algumas aplicações industriais, tais como no campo de produtos têxteis e fibras, químicos e agricultura, todavia, em menor proporção (Hera, 2009). Os níveis de LAS que foram utilizadas no delineamento levaram em conta as concentrações máximas usualmente utilizadas em detergentes. Embora Yangxin et al. (2008) afirmem que o surfactante abrange cerca de 15 a 40% de uma formulação de detergentes e Coelho et al (2008) evidenciam uma porcentagem de 25% de agentes tensionantes em uma formulação de limpeza enzimática.

Cada detergente tem sua melhor temperatura para exercer sua função com mais eficácia. De maneira geral, temperaturas entre 40 a 55° graus são as ideais, mas alguns detergentes podem ser usados em temperatura ambiente também. Por isso, no delineamento foi utilizada a temperatura de 45°C para o ponto central.

Tabela 6 - Matriz do DCCR, do tipo 2^3 para atividade enzimática de protease com os valores reais das variáveis independentes

Ensaio	Surfactante (m/v)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Atividade Residual (U/mL)
1	8,05	33,1	702	2,106
2	19,95	33,1	702	13,854
3	8,05	56,9	702	12,450
4	19,95	56,9	702	1,056
5	8,05	33,1	2058	2,388
6	19,95	33,1	2058	11,778
7	8,05	56,9	2058	17,298
8	19,95	56,9	2058	1,794
9	4	45	1380	0,648
10	24	45	1380	7,674
11	14	25	1380	12,012
12	14	65	1380	7,800
13	14	45	240	8,826
14	14	45	2520	6,498
15	14	45	1380	8,268
16	14	45	1380	8,202
17	14	45	1380	8,682

A significância estatística dos resultados foi verificada pelo teste F e os resultados da análise de variância para atividade enzimática de protease podem ser observados na Tabela 7. De acordo com a ANOVA, foi verificado que o modelo ajustado foi significativo pelo teste F ($p < 0,05$).

Tabela 7 - ANOVA para resposta da atividade de protease (U/mL) em diferentes concentrações de surfactante, temperaturas e intervalo de tempo

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fcal
Reg	330,5788	9	36,73098	6,324531
Res	40,6539	7	5,8077	
Total	371,2327	16		

% variação explicada (R^2) = 89,311; $F_{9,7; 0,05} = 3,68$

Na Tabela 8 foram observados os coeficientes de regressão, p-valor e os limites de confiança para a resposta de atividade enzimática de protease.

Tabela 8 - Coeficiente de regressão dos valores de atividade da protease obtidos para as diferentes concentrações de surfactante, temperatura e tempo, conforme DCCR

Fatores	Coeficiente de Regressão	p - valor	Estimativa por intervalo (95%)	
			Limite Inferior	Limite Superior
Média	8,34101	0,000539	5,05739	11,62463
X_1	0,44361	0,518201	-1,09841	1,98562
X_1^2	-1,34499	0,103087	-3,04220	0,35223
X_2	-0,33783	0,620388	-1,87985	1,20418
X_2^2	0,68618	0,370910	-1,01104	2,38339
X_3	-0,00917	0,989175	-1,55118	1,53285
X_3^2	-0,10720	0,885489	-1,80441	1,59002
$X_1 * X_2$	-6,00475	0,000203	-8,01949	-3,99001
$X_1 * X_3$	-0,80875	0,374130	-2,82349	1,20599
$X_2 * X_3$	0,92275	0,314698	-1,09199	2,93749

X_1 = Surfactante; X_2 = Temperatura; X_3 = Tempo.

Observe que o modelo ajustado fica caracterizado pela EQUAÇÃO 1:

$$Y = 8,34101 + 0,44361 x_1 - 1,34499 x_1^2 - 0,33783 x_2 + 0,68618 x_2^2 - 0,00917 x_3 - 0,10720 x_3^2 - 6,00475 x_1 \cdot x_2 - 0,80875 x_1 \cdot x_3 + 0,92275 x_2 \cdot x_3 \quad (1)$$

Onde x_1 é a concentração de Surfactante, x_2 representa a temperatura e x_3 representa o tempo de exposição.

Após análise dos resultados, foram construídas superfícies de resposta para variável atividade de protease e os resultados estão ilustrados nas figuras 9, 10 e 11.

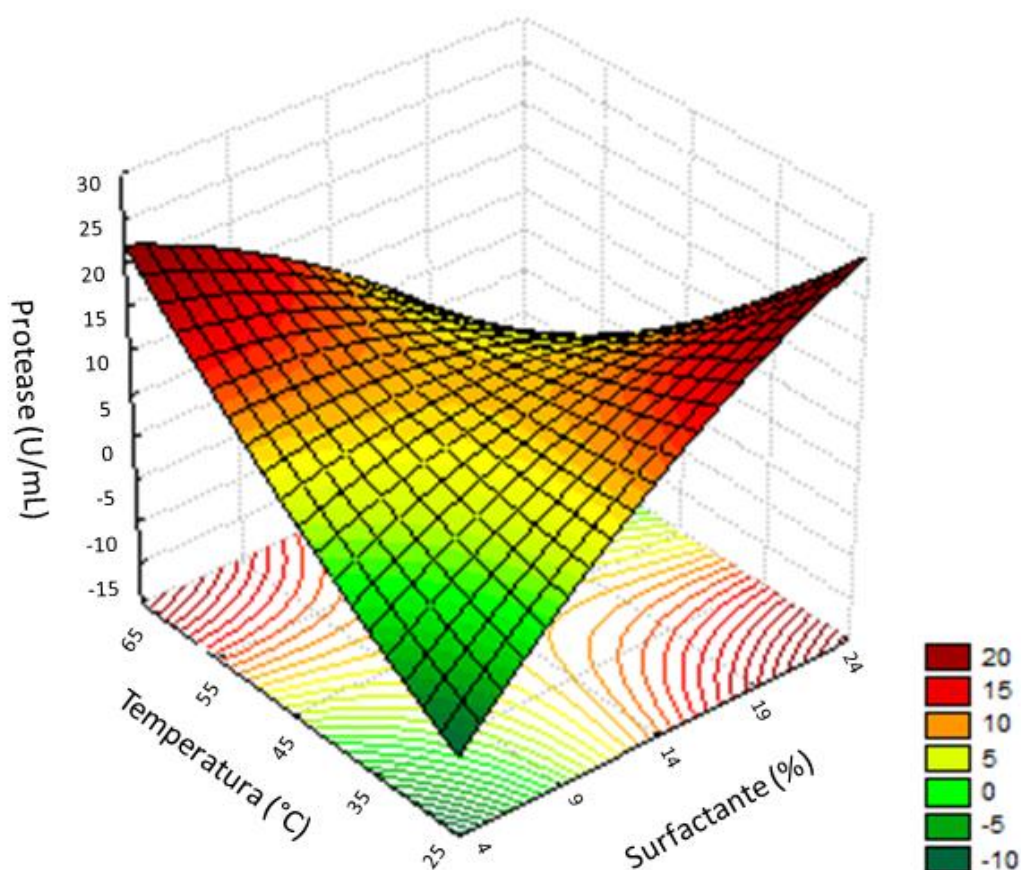


Figura 9 - Superfície de resposta 3D. Efeitos da concentração de surfactante e temperatura na atividade enzimática de protease (U/mL).

Quando o tempo de incubação da enzima foi mantido constante no ponto central (23 h), foi observado que em concentrações do surfactante mais baixas e temperaturas de incubação mais elevadas, a atividade da protease foi maior (FIGURA 9). Porém, em concentrações maiores do surfactante a atividade da protease foi maior, quando temperaturas mais brandas foram utilizadas.

Mantendo a temperatura de incubação constante no ponto central (45 °C), foi verificado que quando a concentração do surfactante aumentou, a atividade da

protease foi maior com o aumento do tempo de incubação. Entretanto, em tempos de incubação mais prolongados, a atividade da enzima decresceu (Figura 10).

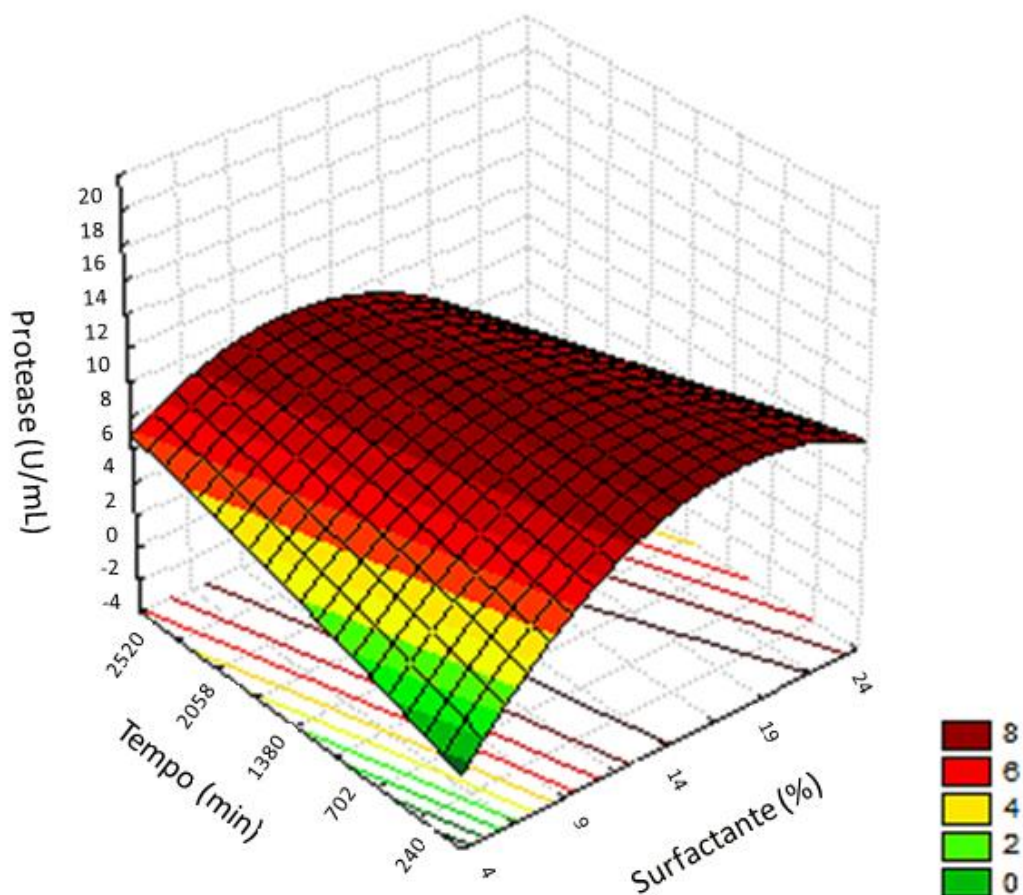


Figura 10 - Superfície de resposta 3D. Efeitos da concentração de surfactante e tempo na atividade enzimática de protease (U/mL).

Foi observado também que quando a concentração do surfactante foi mantida constante no ponto central (14%, m/V), em mais baixas temperaturas e tempo de incubação, a atividade da protease foi mais alta, mas também há um aumento da atividade com maior tempo e temperatura elevada.

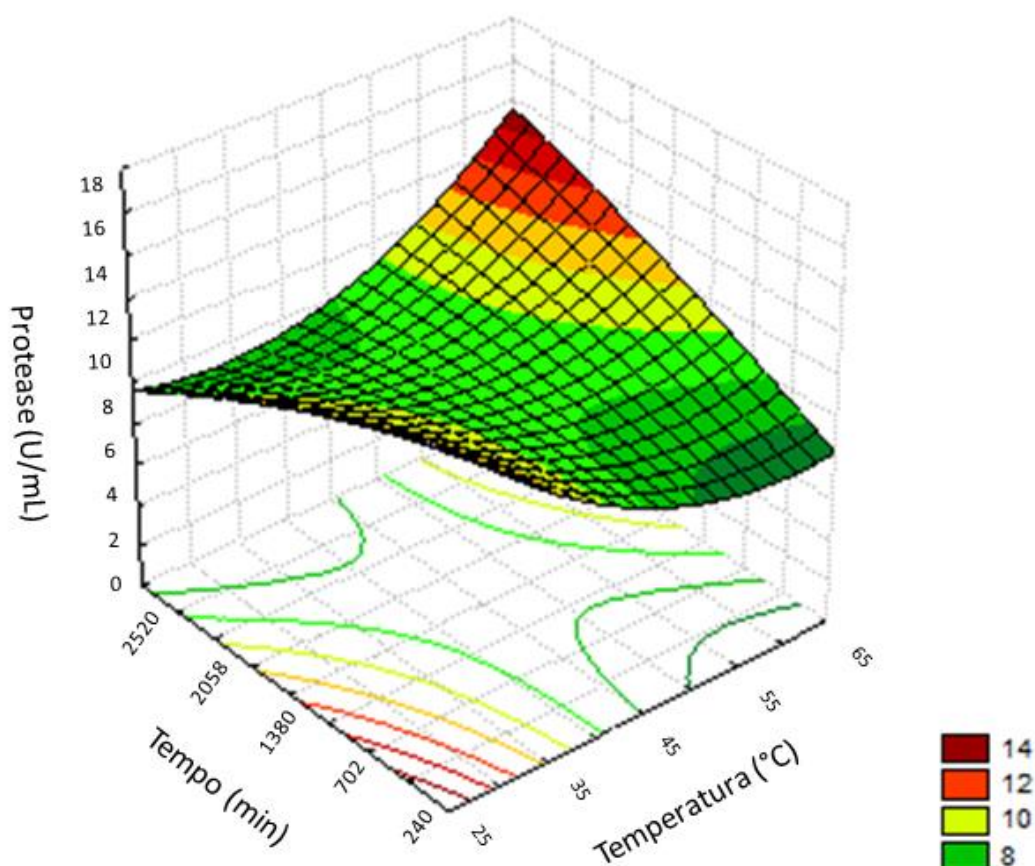


Figura 11 - Superfície de resposta 3D. Efeitos da temperatura e tempo na atividade enzimática de protease (U/mL).

5.3.2. Otimização de concentração de oxidante, temperatura e tempo de exposição

O delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo 2^3 e posterior construção das superfícies de resposta foram utilizados para avaliar as concentrações de oxidante, a temperatura e o tempo em que o extrato enzimático foi exposto, a fim de avaliar qual a melhor condição para maior atividade enzimática de protease (U/mL).

Na Tabela 9 está exposta a Matriz do DCCR para atividade da protease (U/mL).

Tabela 9 - Matriz do DCCR, do tipo 2³ para atividade enzimática de protease com os valores reais das variáveis independentes

Ensaio	Oxidante (m/v)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Protease (U/mL)
1	2,82	33,1	702	14,562
2	8,18	33,1	702	13,206
3	2,82	56,9	702	12,042
4	8,18	56,9	702	7,710
5	2,82	33,1	2058	13,028
6	8,18	33,1	2058	11,148
7	2,82	56,9	2058	7,068
8	8,18	56,9	2058	0,378
9	1	45	1380	13,650
10	10	45	1380	13,344
11	5,5	25	1380	11,712
12	5,5	65	1380	0,006
13	5,5	45	240	11,010
14	5,5	45	2520	7,908
15	5,5	45	1380	9,792
16	5,5	45	1380	9,744
17	5,5	45	1380	9,564

De acordo com a Tabela 6, a atividade de protease variou de 0,006 (ensaio 12) a 14,562 (ensaio 1). A maior atividade de protease foi observada utilizando a concentração de 2,82 (m/v) de oxidante, com a temperatura de 33,1°C e 702 minutos.

O peróxido de hidrogênio é um dos oxidantes mais versáteis que existe, superior ao cloro, dióxido de cloro e permanganato de potássio. Soluções de peróxido de hidrogênio são empregadas no dia-a-dia, tais como cremes de pasta dental a 0,5% (m/v), detergentes para lentes de contato a 2% (m/v), detergentes para branqueamento a 5% (m/v), loções para tratamento de cabelos a 7,5% (m/v), entre outras (Matos et al., 2003). Portanto, as concentrações que foram utilizadas para a realização do delineamento estavam dentro da faixa sugerida na literatura. Além

disso, a escolha da concentração do oxidante utilizada para o ponto central, levou em consideração a sua finalidade que foi para formulações de detergentes.

A significância estatística dos resultados foi verificada pelo teste F e os resultados da análise de variância para atividade enzimática de protease podem ser observados na tabela 10. De acordo com a ANOVA, foi verificado que o modelo ajustado foi significativo pelo teste F ($p < 0,1$).

Tabela 10 - ANOVA para resposta da atividade de protease (U/mL) em diferentes concentrações de oxidante, temperaturas e intervalos de tempo.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fcal
Regressão	252,4794	9	28,05327	13,58286
Resíduo	14,4574	7	2,065343	
Total	266,9368	16		

% Variação explicada (R^2) = 94,913; $F_{9,7; 0,1} = 2,72$

Na tabela 11 foram observados os coeficientes de regressão, p – valor e os limites de confiança para resposta de atividade enzimática de protease.

Tabela 11 - Coeficiente de regressão dos valores da atividade enzimática de protease, obtidos para diferentes concentrações de oxidante, temperatura e tempo, conforme DCCR

Fatores	Coef. de Regressão	p - valor	Estimativa por intervalo (90%)	
			Limite Inferior	Limite Superior
Média	9,68109	0,000008	8,11218	11,24999
X ₁	-1,08168	0,027240	-1,81845	-0,34491
X ₁ ²	1,40760	0,013328	0,59667	2,21852
X ₂	-3,25351	0,000068	-3,99029	-2,51674
X ₂ ²	-1,29285	0,019373	-2,10377	-0,48192
X ₃	-1,54613	0,005352	-2,28290	-0,80935
X ₃ ²	-0,02005	0,963940	-0,83098	0,79087
X ₁ * X ₂	-0,97329	0,096964	-1,93593	-0,01065

Tabela 11, Cont.;

$X_1 * X_3$	-0,36021	0,501285	-1,32285	0,60243
$X_2 * X_3$	-1,08921	0,069256	-2,05185	-0,12657

X_1 = Oxidante; X_2 = Temperatura; X_3 = Tempo.

Observe que o modelo ajustado fica caracterizado pela EQUAÇÃO 2:

$$Y = 9,68109 - 1,08168 x_1 + 1,40760 x_1^2 - 3,25351 x_2 - 1,29285 x_2^2 - 1,54613 x_3 - 0,02005 x_3^2 - 0,97329 x_1 \cdot x_2 - 0,36021 x_1 \cdot x_3 - 1,08921 x_2 \cdot x_3. \quad (2)$$

Onde x_1 é a concentração de oxidante, x_2 representa a temperatura e x_3 o tempo de exposição.

Após análise dos resultados, foram construídas superfícies de resposta para variável atividade de protease. Os resultados estão apresentados na Figura 12, 13 e 14.

Quando o tempo de incubação da enzima foi mantido constante no ponto central (23 h), foi observado que as melhores atividades enzimáticas da protease foram alcançadas em temperaturas mais brandas e concentrações extremas do oxidante, porém é possível obter valores de atividade elevados com temperaturas mais elevadas e menores concentrações de oxidante (Figura 12).

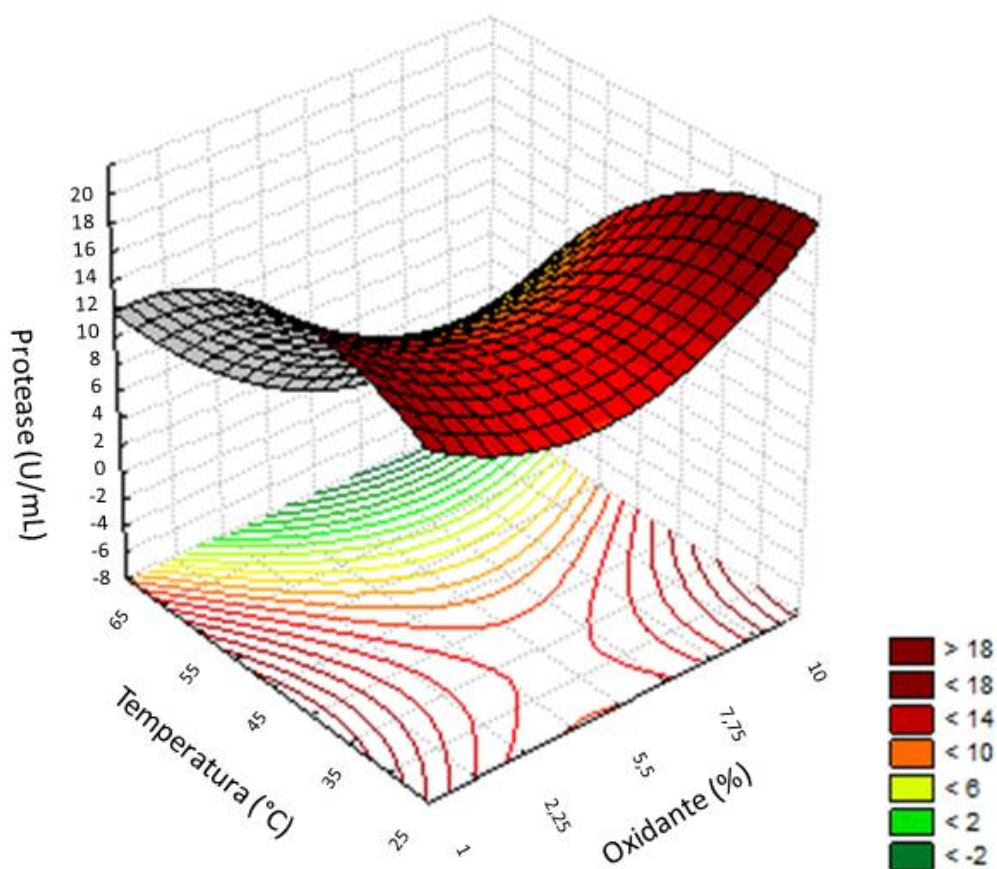


Figura 12 - Superfície de resposta 3D. Efeitos da concentração de oxidante e temperatura na atividade enzimática de protease (U/mL).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 13, mantendo a temperatura de incubação constante no ponto central (45°C), a protease apresentou maior atividade, quando incubada em baixas concentrações do oxidante com intervalos de tempo maiores. Além disso, também foi observado que concentrações mais altas do oxidante podem ser utilizadas para a obtenção de alta atividade enzimática, desde que o tempo de incubação seja mais baixo.

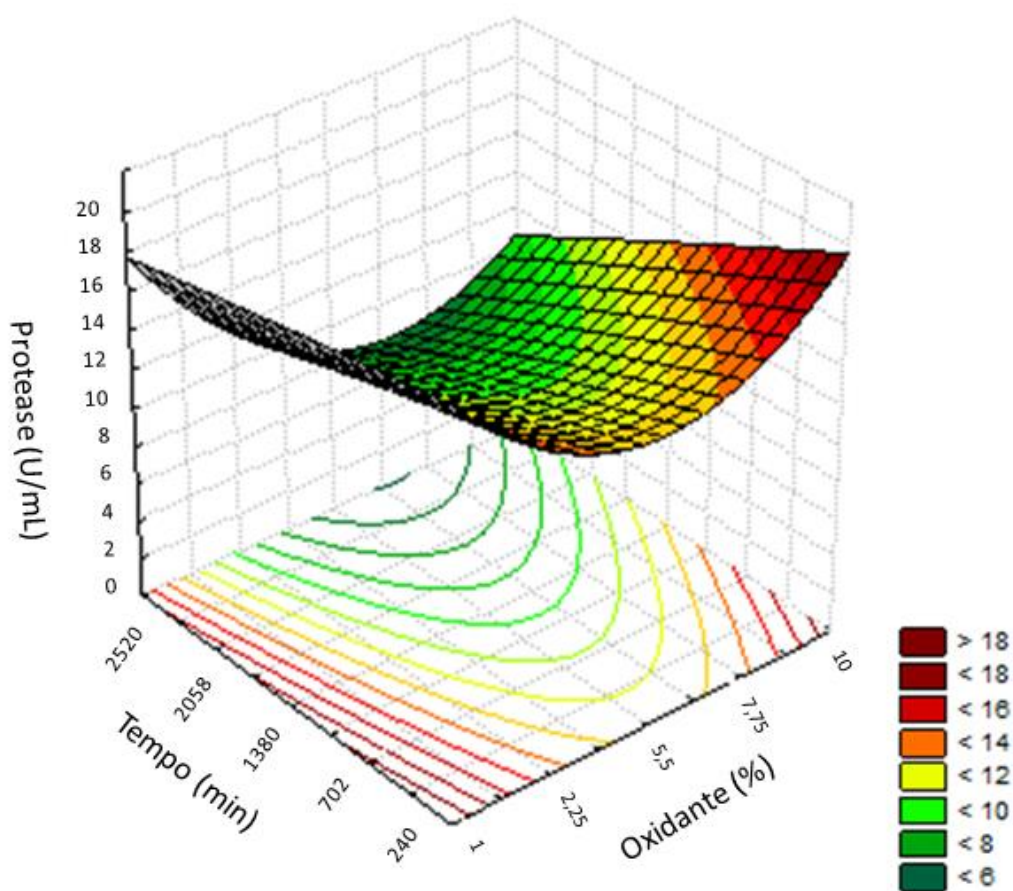


Figura 13 - Superfície de resposta 3D. Efeitos da concentração de oxidante e do tempo de exposição na atividade enzimática de protease (U/mL).

Observou-se também que, mantendo a concentração do oxidante constante no ponto central (5,5%, m/V), a protease pode ser incubada em intervalos de tempo mais altos, quando a temperatura de incubação utilizada for mais branda. Porém, em temperaturas mais elevadas, o intervalo de tempo de incubação da enzima deve ser menor, para alcançar maior atividade da mesma.

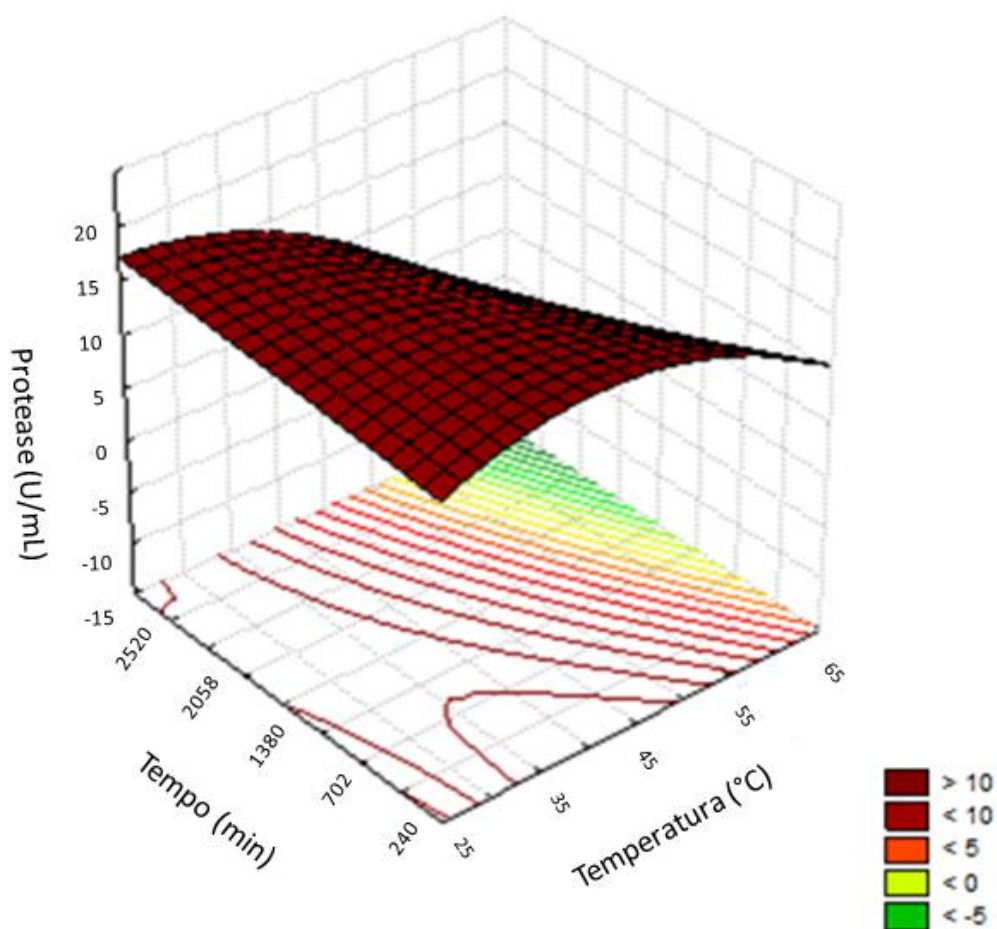


Figura 14 - Superfície de resposta 3D. Efeitos da temperatura e do tempo de exposição na atividade enzimática de protease (U/mL).

5.3.3. Otimização da concentração de surfactante, concentração de oxidante e tempo de exposição

Um delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo 2^3 e posterior construção das superfícies de resposta foram utilizados para avaliar as concentrações de surfactante, concentrações de oxidante e o tempo de incubação da enzima a 45°C , a fim de otimizar a condição para obtenção de maior atividade da protease. Na tabela 12 está exposta a Matriz do DCCR para atividade da protease (U/mL).

Tabela 12 - Matriz do DCCR, do tipo 2³ para atividade enzimática de protease com os valores reais das variáveis independentes

Ensaio	Surfactante (m/v)	Oxidante (m/v)	Tempo (min)	Protease (U/mL)
1	8,05	2,82	702	9,486
2	19,95	2,82	702	10,086
3	8,05	8,18	702	8,130
4	19,95	8,18	702	12,726
5	8,05	2,82	2058	11,624
6	19,95	2,82	2058	12,708
7	8,05	8,18	2058	9,264
8	19,95	8,18	2058	13,536
9	4	5,5	1380	8,202
10	24	5,5	1380	17,682
11	14	1	1380	10,746
12	14	10	1380	8,400
13	14	5,5	240	8,616
14	14	5,5	2520	9,306
15	14	5,5	1380	9,054
16	14	5,5	1380	9,330
17	14	5,5	1380	9,066

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 9, a atividade enzimática de protease variou de 8,130 (Ensaio 3) a 17,682 (Ensaio 10). A maior atividade de protease foi observada utilizando a concentração de 24 (m/v) de surfactante, concentração de 5,5 (m/v) de oxidante e 1380 minutos.

A significância estatística dos resultados foi verificada pelo teste F e os resultados da análise de variância para atividade enzimática de protease podem ser observados na Tabela 13. De acordo com a ANOVA, verificou-se que o modelo ajustado foi significativo pelo teste F ($p < 0,1$).

Tabela 13 - ANOVA para resposta da atividade de protease (U/mL) em diferentes concentrações de surfactante, oxidante e tempo

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fcal
Regressão	88,1086	9	9,789844	6,333716
Ressíduo	10,8197	7	1,545671	
Total	98,9283			

% Variação explicada (R^2) = 89,23; $F_{2,72; 0,1} = 2,72$

Na Tabela 14 observaram os coeficientes de regressão, p – valor e os limites de confiança para resposta de atividade enzimática de protease.

Tabela 14 - Coeficiente de regressão dos valores da atividade enzimática de protease, obtidos para diferentes concentrações de surfactante e oxidante e em diferentes intervalos de tempo, conforme DCCR

Fatores	Coeficiente de Regressão	p - valor	Estimativa por intervalo (90%)	
			Limite Inferior	Limite Superior
Média	9,12605	0,000004	7,76880	10,48330
X ₁	1,94007	0,000686	1,30270	2,57745
X ₁ ²	1,42317	0,006346	0,72165	2,12470
X ₂	-0,30707	0,391726	-0,94444	0,33031
X ₂ ²	0,23205	0,550745	-0,46947	0,93358
X ₃	0,57587	0,130678	-0,06151	1,21324
X ₃ ²	0,01568	0,967412	-0,68585	0,71720
X ₁ * X ₂	0,89801	0,080356	0,06524	1,73079
X ₁ * X ₃	0,01999	0,965001	-0,81279	0,85276
X ₂ * X ₃	-0,25201	0,449549	-1,18479	0,48076

X₁ = Surfactante; X₂ = Oxidante; X₃ = Tempo.

Observe que o modelo ajustado fica caracterizado pela EQUAÇÃO 3:

$$Y = 9,12605 + 1,94007x_1 + 1,42317x_1^2 - 0,30707x_2 + 0,23205x_2^2 + 0,57587x_3 + 0,1568x_3^2 + 0,89801x_1 \cdot x_2 + 0,01999x_1 \cdot x_3 - 0,25201x_2 \cdot x_3 \quad (3)$$

Onde x_1 é a concentração de surfactante, x_2 representa a concentração de oxidante e x_3 o tempo de exposição.

Após análise dos resultados, foram construídas superfícies de resposta para variável atividade de protease e os resultados estão ilustrados nas Figuras 15, 16 e 17.

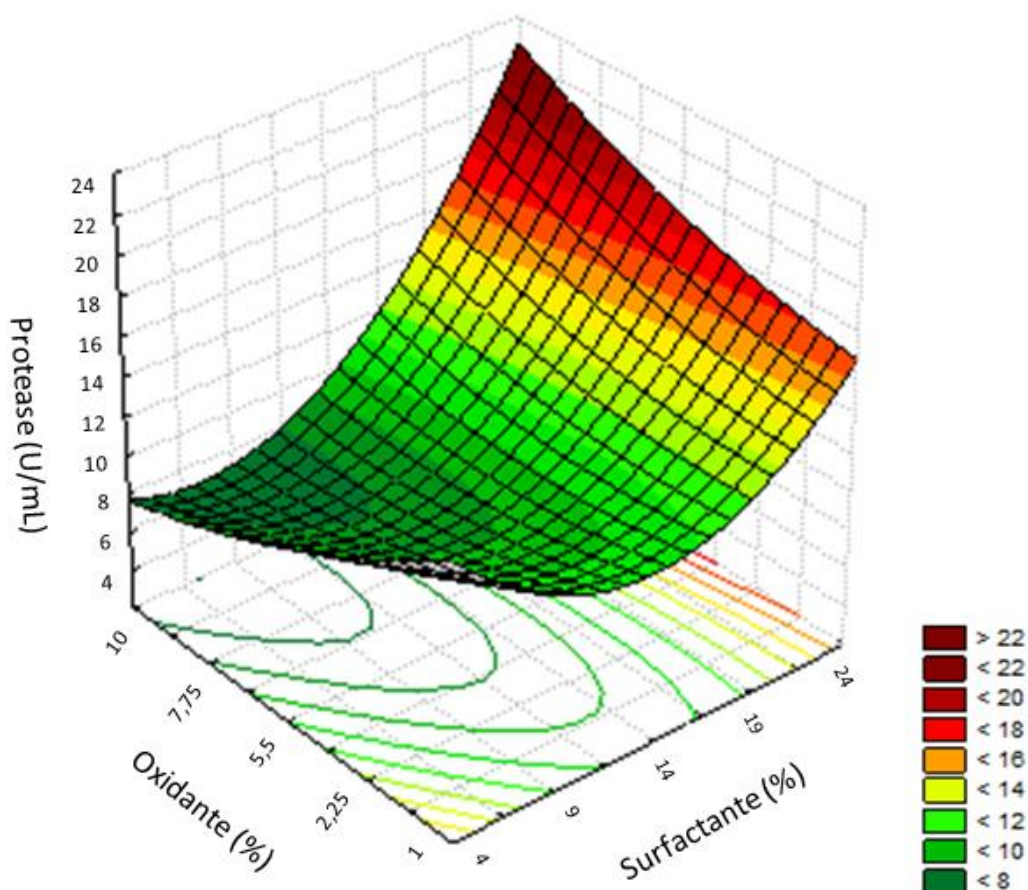


Figura 15 - Superfície de resposta 3D. Efeitos das concentrações de surfactante e concentrações de oxidante na atividade enzimática de protease (U/mL).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 15, concentrações elevadas de oxidante em conjunto com concentrações elevadas de surfactante potencializaram a atividade enzimática de protease, quando a incubada por 23 h a 45°C. Contudo, quando incubada nestas mesmas condições em concentrações elevadas de oxidante, mas com concentrações menores de surfactante, a atividade enzimática de protease foi reduzida.

Mantendo a concentração do oxidante constante no ponto central (5,5%, m/V), foi observado que o tempo não foi um fator limitante na estabilidade da protease, quando concentrações altas do surfactante foram utilizadas (Figura 16).

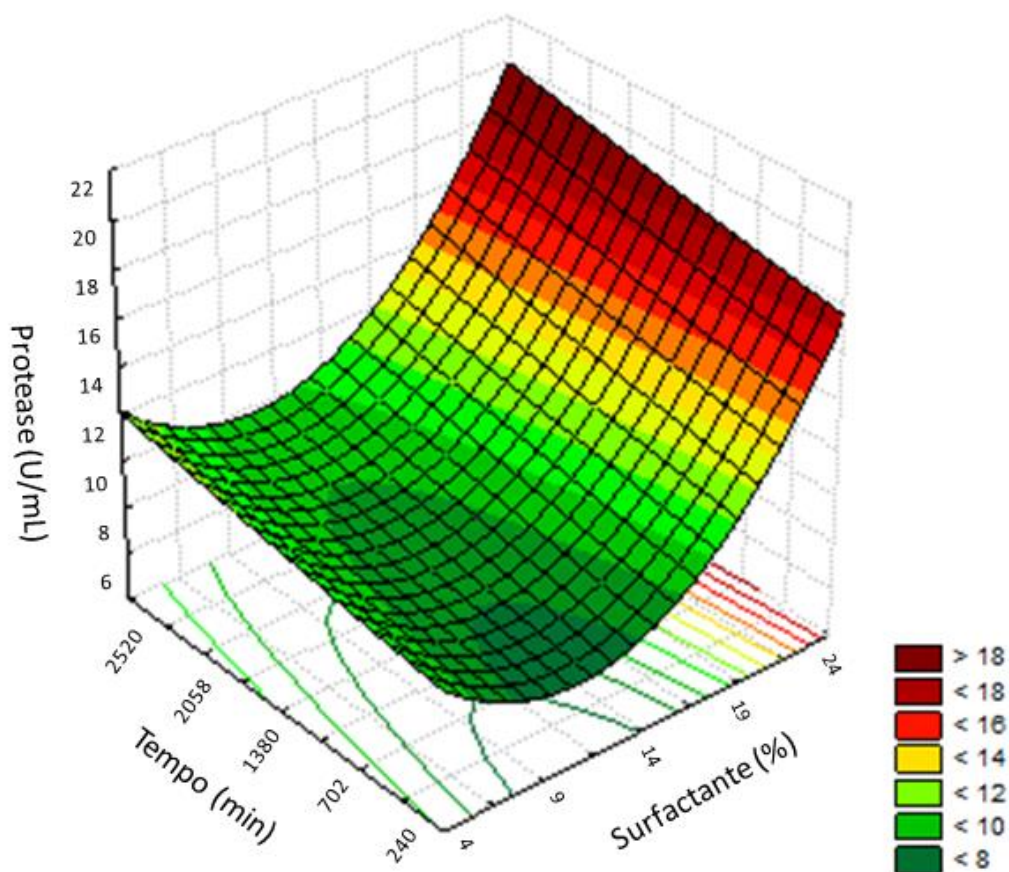


Figura 16 - Superfície de resposta 3D. Efeitos da concentração de surfactante e do tempo de exposição na atividade enzimática de protease (U/mL).

Finalmente, de acordo com a Figura 17, mantendo a concentração do surfactante constante no ponto central (14%, m/V), a atividade da protease foi estimulada, quando baixas concentrações de oxidante e intervalos maiores de tempo foram utilizados.

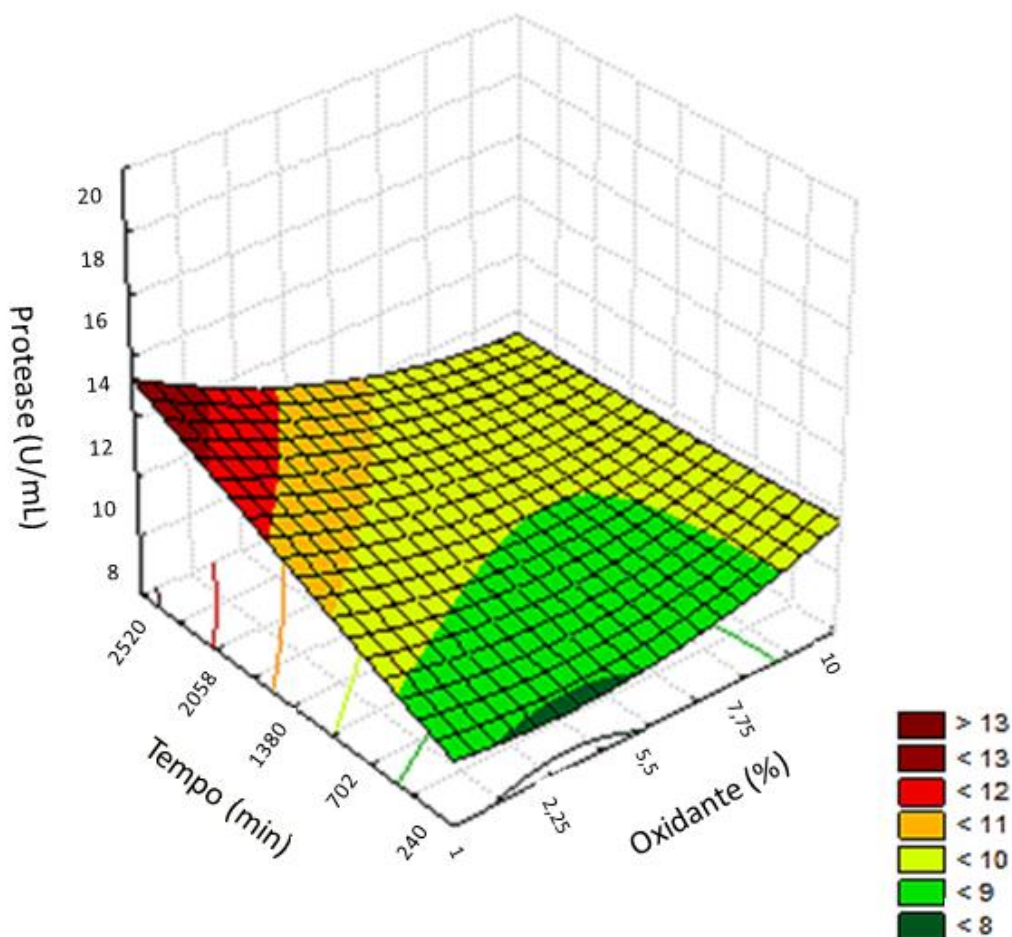


Figura 17 - Superfície de resposta 3D. Efeitos da concentração de oxidante e do tempo de exposição na atividade enzimática de protease (U/mL).

5.4. Efeito do desempenho de lavagem

O desempenho de uma solução de limpeza selecionada a partir dos estudos de otimização, na lavagem de tecidos de roupa foi avaliado. Para a seleção da solução foram levados em conta os efeitos tóxicos do LAS e a estabilidade da enzima. Assim, a solução de limpeza do ensaio 10 foi selecionada.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 18, exceto quando efetuada a lavagem com água, todos os detergentes comerciais e a solução 10, apresentaram um aumento no parâmetro "L", demonstrando uma boa eficiência no clareamento do tecido. Ressalta-se, entretanto que os maiores valores deste parâmetro foram obtidos para o detergente Omo® (maiores valores indicam coloração mais clara), sugerindo que este produto contém componentes mais eficazes na remoção desse tipo de sujidade, incluindo provavelmente, maiores quantidades de enzimas.

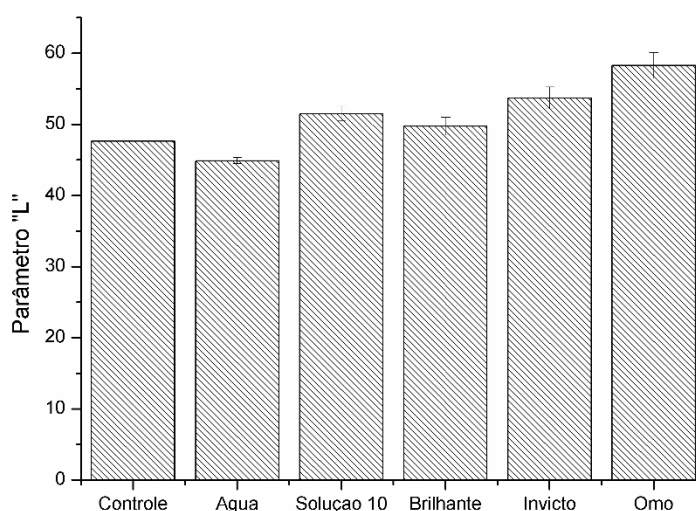


Figura 18 - Parâmetros "L" observados utilizando uma solução de limpeza proposta e detergentes comerciais em 0,7% (m/v).

Em relação ao parâmetro Chroma (Figura 19), o detergente Omo® apresentou o menor valor (cores mais claras) indicando que esse detergente foi o mais eficiente na remoção das sujidades de sangue dos tecidos. Entretanto, a solução 10 apresentou valores similares aos demais detergentes comerciais testados, demonstrando a eficiência da mesma na lavagem dos tecidos.

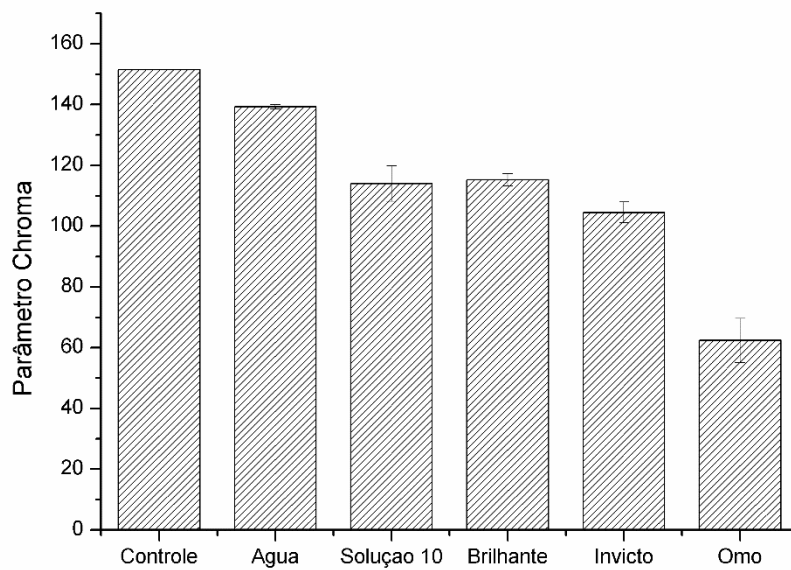


Figura 19 - Parâmetros Chroma observados utilizando uma solução de limpeza proposta e detergentes comerciais em 0,7% (m/v).

6. CONCLUSÕES

A protease de *Bacillus* sp. SMIA-2 apresentou compatibilidade com peróxido de hidrogênio e carbonato de sódio e alta compatibilidade com o surfactante LAS. Além disso, foi estável nesses compostos, uma vez que a atividade residual se manteve próxima da atividade obtida pelo controle, quando incubada por 2h a 60°C.

A otimização da concentração de surfactante, oxidante e tempo, usando o delineamento composto central rotacional, do tipo 2³, demonstrou que a enzima foi estimulada quando maiores concentrações de LAS foram utilizadas. Além disso, foi possível observar que a enzima foi capaz de ser empregada em diferentes temperaturas, observando sua capacidade termofílica, quando se ajusta as concentrações de surfactante e oxidante a serem utilizadas, de acordo com a finalidade do produto. Que o tempo não foi um fator limitante, ampliando as possibilidades de sua utilização e que a concentração de oxidante pode ser reduzida sem apresentar perda da atividade relativa de protease.

Uma solução contendo (%m/v) 24 - LAS, 5,5 - H₂O₂, 0,5 - Na₂CO₃ e 12,45 U/mL de protease, diluída a 0,7% (m/v), foi eficiente na remoção de sujidades de sangue dos tecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barbosa, J.B.; Ladeira, S.A.; Martins, M.L.L. (2014) Cheese whey and passion fruit rind flour as substrates for protease production by *Bacillus* sp SMIA-2 strain isolated from brazilian soil. *Biocatalysis & Biotransformation*, 32: 244-250.
- Barros, F. F. C; Quadros, C. P; Júnior, M. R. M; Pastore, G. M. (2007). Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Quim. Nova*, 30 (2): 409-414.
- Behring, J. L; Lucas, M; Machado, C; Barcellos, I. O. (2004). Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação da CMC de surfactantes no ensino da química. *Quim. Nova*, 27 (3): 492-495.
- Berg, J. M.; Stryer, L.; Tymoczko, J. L. (2004). *Bioquímica*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1104 p.
- Biermann, M. et al. (1987). *Surfactants in Consumer Products*. Berlim: Spring-Verlag. 548p.
- Brasil (1977). Decreto Nº 79.094, de 5 de Janeiro De 1977. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/Antigos/D79094.htm>. Acesso em: 15 jul. 2017.
- Bugay, C. (2012). *Biossurfactantes produzidos por Bacillus* sp. Dissertação (Mestrado), Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná.
- Buxbaum, Engelbert. (2011) *Biophysical Chemistry of Proteins: An Introduction to Laboratory Methods*. Springer US. 510p.
- Calado, Verônica; Montgomery, Douglas C. (2003). Planejamento de Experimentos usando Statistica. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais. 260p.

- Çalik, P., Bilir, E., Çalik, G., Özdamar, T. H. (2002). Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Enzyme Microb. Technol.* 31: 685–697.
- Coelho, M. A. Z.; Salgado, A.M.; Ribeiro, B. D. (2008). *Tecnologia Enzimática*. Rio de Janeiro: FAPERJ; Petrópolis, RJ: EPUB. 288p.
- Demain, A. L.; Adrio, J. L. (2008). Contributions of microorganisms to industrial biology. *Molecular Biotechnology*, 38: 41-55.
- Deng, A.; Wu, J.; Zhang, Y.; Zhang, G.; Wen, T. (2010). Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001. *Bioresource Technology*. 101 (18): 7100-7106.
- Desai, J. D.; Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potencial. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61: 47-64.
- Essential Industries. (2017) *Essential Industries, Inc.* Disponível em: <<http://www.essind.com/Cleaners/GC-chemistry.htm#Soil>>. Acesso em: 23 Agosto.
- Fellows, P. J. (2006). Tecnologia das fermentações e enzimas. In: _____. *Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed. p. 183-206.
- Gentil, N.O. (2014). *Purificação de proteases termorresistentes secretadas por Bacillus sp. SMIA-2 em culturas submersas contendo substratos de baixo custo*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 58p.
- Greene, R. V., Griffin, H., Cotta, M. A. (1996). Utility Of Alkaline Protease From Marine Shipworm Bacterium In Industrial Cleansing Applications. *Biotechnology Letters*, 18 (7): 759-764.
- Gupta, R., Beg, Q. K., Khan, S., Chauhan, B. (2002) An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology Biotechnology*, 60: 381–395.
- Gupta, R.; Beg, Q.; Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 15–32.
- Hera. (2009). Human & Environmental Risk Assessment on ingredients of European household cleaning products - Linear Alkylbenzene Sulphonate, LAS.
- Jansen, P.H., Peek, K., Morgan, H.W. (1994) Effect of culture conditions on the production of a extracellular proteinase by *Thermus* sp. Rt41A. *Applied Microbiology Biotechnology*, 41:400-406.

- Johnvesly, B. E Naik, G.R. (2001). Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochem.* 37: 139-144.
- Joo, H. S.; Chang, C. S. (2005). Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry.* 40: 1263-1270.
- Jurado, E.; Fernandez-Serrano, M.; Ndfiez-Olea, J.; Lechuga, M. (2007). Primary Biodegradation of Commercial Fatty-Alcohol Ethoxylate Surfactants: Characteristic Parameters. *Journal of Surfactants and Detergents*, 10: 145-153.
- Kara, S., Honke, I., Kaebernick, H. (2005). *An integrated framework for implementing sustainable product development*. In: International Symposium On Environmentally Conscious Design And Inverse Manufacturing, Tokyo. Proceedings. Tokyo: EcoDeNet. p. 684-691.
- Ladeira, S. A. ; Delatorre, Andreia Boechat ; Cruz, E; Barbosa, J. B; Martins, M. L. L. (2015). Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1: 92-98.
- Ladeira, S. A.; Andrade, MVV ; Delatorre, Andreia Boechat ; Perez, V. H. ; Martins, M. L. L. (2010). Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. *Química Nova*, 33: 324-328.
- Lima, U. A., Aquarone, E., Borzani, W., Schimidell, W. (2001). *Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Blucher, 3: 593.
- Luz, Fabrício Ferreira. (2007). *Desenvolvimento de um detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras e avaliação de sua viabilidade econômica de produção*. 145 f. Dissertação. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS.
- Maniasso, Nelson. (2001). Ambientes micelares em química analítica. *Quim. Nova*, 24 (1) 87-93.
- Martín, M.; Martínez, A. (2013). A methodology for simultaneous process and product design in the formulated consumer products industry: The case study of the detergent business. *Chemical Engineering Research and Design*, 91: 795-809.
- Martins, M. B. D. O. (2009). *Avaliação do potencial de formação de AOX na indústria de detergentes*. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- Mattos, I.L., Shiraishi, K. A., Braz, A. D., Fernandes, J. R. (2003). Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. *Quim. Nova*, 26 (3): 373-380.

- Maurer, K. H. (2004). Detergents proteases. *Current opinion in Biotechnology*. 15: 330-334.
- Mendelson, C. (2010). *Laundry: The Home Comforts Book of Caring for Clothes and Linens*. 1ª Edição Reimpressa. ed. [S.I.]: Scribner. 416p.
- Mercade, M. E.; Manresa, M. A. (1994). The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. *Journal of America Oil Chemists Society*. 71: 61-64.
- Nadeem, M.; Qazi, J.I.; Baig, S.; Syed, Q. (2008). Protease Production by *B. licheniformis* N-2, *Food Technol. Biotechnol.* 46 (4): 388–394.
- Nitschke, M., Pastore, G. M. (2002). Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*, 25 (5): 772-776.
- Novozyme (2017). Disponível em: <<http://novozyme.com>>. Acessado em: agosto de 2017.
- Nunes, A. S.; Martins, M. L. L. (2001). Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32 (2): 271-275.
- Penteado, J.C.P.; El Seoud, O.A.; Carvalho, L.R.F. (2006) Alquilbenzeno sulfonato linear: uma abordagem ambiental e analítica *Quím. Nova* [online]. 29 (5): 1038-1046
- Preté, Paulo Sérgio Castilho. (2006). *Solubilização de membranas eritrocitárias: análise quantitativa do efeito hemolítico induzido por surfactantes*. 123 f. Tese. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP.
- Ray, A. (2012) Protease enzyme-potential industrial scope. *International Journal of Technology*, 2: 1-4.
- Rocha, J. M. S. (SD). Aplicações de Agentes Tensoactivos em Biotecnologia. *Boletim de Biotecnologia*. p.5-11.
- Rodrigues, Maria Isabel, Iemma, Antônio Francisco. (2014). *Planejamento de experimentos e otimização de processos*. 3. Ed. Campinas: Cáritas Editora.
- Rodrigues, Priscila Maria. (2012). *Estabilidade de amilases e proteases produzidas simultaneamente por Bacillus sp. SMIA-2 e compatibilidade das enzimas com componentes de formulações de detergentes*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 58p.
- Rodrigues, P. M. ; Andrade, V. V. V ; Martins, M. L. L. (2013) . Stability And Activity Of The Partially Purified Spray-Dried Protease From *Bacillus* Sp SMIA-2 And Its Characterization As A Laundry Detergent Additive. *International Journal of Bioassays*, 2: 562-567.

- Rodríguez, V.B.; Alameda, E.J.; Gallegos, J.F.M.; Requena, A.R.; López, A.I.G. (2006). Thermal deactivation of a commercial α -amylase from *Bacillus licheniformis* used in detergents. *Biochemical Engineering Journal*. v. 27, p. 299-304.
- Russell, G.L., Britton, L.N. (2002). Use of certain alcohol ethoxylates to maintain protease stability in the presence of anionic surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*. 5(1), p.5-10.
- Santos, A. F. (2014) *Prospecção e Produção de Proteases Bacterianas por Fermentação em Estado Sólido*. 2014. 136 f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro.
- Sellami-Kamoun, A. et al. (2008). Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. *Microbiological Research*, 163 (3): 299-306.
- Silva, Ronivaldo Rodrigues da. (2011). *Fermentação, purificação e caracterização da protease produzida pelo fungo Aspergillus fumigatus Fresenius*. São José do Rio Preto: [s.n.], 58 f.
- Smith, Colleen., Marks, Allan D., Lieberman, Michael. (2007) *Bioquímica médica básica de Marks*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed. 992p.
- Souza, T. F. O., Oliveira, S. D., Santos, A. F., Freire, D. M. G., Carmo, F. L. (2017). Mapeamento tecnológico da aplicação de proteases em detergentes e composições de limpeza. *Cad. Prospec.*, Salvador, 10 (2) : 226-236.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. (2012). *Microbiologia*. 10. ed. Porto Alegre: Artmed. 934 f.
- Yangxin, Y.; Jin, Z.; Bayly, A. E. (2008). Development of Surfactants and Builders in Detergent Formulations. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, Agosto. p. 517-527.
- Zajic J.E., Seffens W (1984) Biosurfactants. *CRC Crit Rev Microbiol*. 5: 87–107.