

INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE – *CAMPUS* ARAQUARI

**ELIAKIN SATO DE BORBA, ERICH GRÜNFELD FILHO, LUÍS
GUILHERME HARTIN, MATHEUS FELIPE ROCHA FERRAZ BELO,
MAYKON ALLAN SOLDATI QUANDT**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM
DIFERENTES MARCAS DE DETERGENTES COMERCIAIS**

ARAQUARI/SC

2017

**ELIAKIN SATO DE BORBA, ERICH GRÜNFELD FILHO, LUÍS
GUILHERME HARTIN, MATHEUS FELIPE ROCHA FERRAZ BELO,
MAYKON ALLAN SOLDATI QUANDT**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM
DIFERENTES MARCAS DE DETERGENTES COMERCIAIS**

Trabalho de defesa do Projeto de Iniciação Científica Integrada (PIC-QUIMI) apresentado ao Instituto Federal Catarinense – *Campus* Araquari como parte complementar à matriz curricular do Curso Técnico em Química Integrado ao Ensino Médio.

ARAQUARI/SC

2017

RESUMO

A partir de 2007 a produção de detergentes teve grande valorização no mercado nacional de acordo com o anuário de 2012 da ABIPLA (Associação Brasileira das Indústrias de Produtos de Limpeza e Afins), mostrando que em cinco anos houve um aumento de aproximadamente 21% no faturamento desse setor. Algumas enzimas são adicionadas na formulação de detergentes têxteis líquidos e sólidos (pó e barra) para que estas proteínas catalisadoras acelerem a velocidade de reações químicas importantes para auxiliar na remoção de matéria orgânica, diminuindo os custos da limpeza, além de serem biodegradáveis, ecologicamente corretas e não agressivas para os consumidores. As enzimas utilizadas e aprovadas pela Resolução Normativa ANVISA nº 1, de 27 de novembro de 1978 são as amilases, proteases e lipases, obtidas a partir de fontes diversas. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade amilolítica, proteolítica e lipásica em diferentes marcas de sabões têxtil domésticos (líquido, pó e em barra). A metodologia analítica para a determinação da atividade enzimática foi baseada no protocolo preconizado pela Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA nº 55, de 14 de novembro de 2012. Os experimentos foram efetuados em triplicata e testes estatísticos de comparação de médias foram utilizados para a avaliação das marcas testadas. Os resultados mostraram que ambas as marcas analisadas apresentaram atividades variadas das três enzimas testadas onde a marca nomeada de A apresentou maiores valores da razão atividade/preço, enquanto que a marca D apresentou os menores valores em comparação às demais marcas testadas.

PALAVRAS-CHAVE: Amilase; Biodegradáveis; Enzimas; Lipase; Protease.

ABSTRACT

As of 2007, the production of detergents was highly valued in the domestic market, according to the ABIPLA (Brazilian Association of Cleaners and Related Products Industries) yearbook of 2012, showing that in five years there was an increase of about 21% in sales of this sector. Some enzymes are added in the formulation of liquid and solid textile detergents (powder and bar) so that these catalytic proteins accelerate the speed of chemical reactions in order to aid in the removal of organic matter, reducing the costs of cleaning, and are biodegradable, ecologically correct and not aggressive or toxic to consumers. These enzymes are highly specific to their substrates, accelerating reactions at rates much higher than those presented by chemical catalysts. The enzymes used and approved by Normative Resolution ANVISA no. 1, of November 27, 1978, are amylases, proteases and lipases, obtained from several sources. This way, the objective of this work was to evaluate the amilolytic, proteolytic and lipolytic activity in different brands of domestic soap (liquid, powder and bar). The analytical methodology for the determination of the enzymatic activity was based on the protocol recommended by the Resolution of the Collegiate Board of ANVISA n ° 55, of November 14, 2012. The experiments were carried out in triplicate and statistical tests of comparison of averages were used for the evaluation of the brands tested. The results showed that the analyzed brands presented varied activities of the three enzymes tested, where a brand named as A displayed higher values of activity/price ratio, rather than the brand D displayed the lowest values compared to the other tested brands.

KEY WORDS: Amylase; Biodegradable; Enzymes; Lipase; Protease.

SUMÁRIO

CONTEÚDO

1	TEMA	5
1.1	DELIMITAÇÃO DO TEMA	5
2	OBJETIVOS	5
2.1	OBJETIVO GERAL	5
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3	INTRODUÇÃO	6
4	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	7
4.1	ENZIMAS	7
4.2	CLASSIFICAÇÃO DE ENZIMAS E FATORES QUE INFLUENCIAM NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	7
4.3	TIPOS DE ENZIMAS APLICADAS A PRODUTO DE LIMPEZA	8
4.4	DETERGENTES ENZIMÁTICOS	9
5	METODOLOGIA DA PESQUISA	12
5.1	COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS	12
5.2	ATIVIDADE AMIOLÍTICA	12
5.3	ATIVIDADE PROTEOLÍTICA	13
5.4	ATIVIDADE LIPÁSICA	14
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	15
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	16
7	CONCLUSÃO	19
8	REFERÊNCIAS	

1 TEMA

Atividade enzimática

1.1 DELIMITAÇÃO DO TEMA

Este projeto de pesquisa delimitou-se em analisar as atividades amilolítica, proteolítica e lipásica em amostras de sabões têxteis líquidos, em pó e em barra, de uso doméstico e adquiridos em comércios locais, tendo como referência a legislação brasileira relacionada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a atividade enzimática em diferentes marcas de sabão em pó, líquido e em barra.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar atividade de amilase, protease e lipase em diferentes marcas de sabões têxteis comerciais líquido, em pó e em barra;
- Fazer uma análise comparativa entre as marcas analisadas.

3 INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas catalisadoras que aceleram a velocidade das reações químicas que ocorrem nos sistemas biológicos. Sua alta especificidade e seletividade sobre seus substratos faz com que catalisem as reações sem serem degradadas (MOTTA, 2000). O uso de enzimas tem sido relatado desde tempos remotos, tais como na utilização do esterco para o amolecimento do couro e do coalho na preparação do queijo. A ciência enzimática começou a ser observada quando Lazzaro Spallanzani observou a reação de degradação enzimática da carne pelo suco gástrico (COELHO, 2008). A partir do século XX o estudo de enzimas se intensificou devido ao interesse industrial, uma vez que uma das maiores fontes produtoras são os microrganismos, sendo matéria prima abundante e de baixo custo de produção, possibilitando assim o avanço científico e tecnológico enzimático (COELHO, 2008; ZIMMER, 2009). Desta forma, a indústria de produtos de limpeza estuda intensivamente a aplicação de enzimas nos seus produtos, tais como amilases, proteases e lipases (ZIMMER,2009).

O setor de detergentes representa uma parte da indústria química que está gerando muito lucro para os investidores atualmente, porém há uma grande preocupação com as questões ambientais relacionadas. De acordo com a Novozymes, a maior fornecedora desse tipo de matéria prima, as questões ambientais estão em pauta, gerando a necessidade da utilização de detergentes domésticos mais sustentáveis, contendo insumos totalmente biodegradáveis. De acordo com pesquisas realizadas pela Nielsen, líder no mercado mundial de enzimas, no segundo semestre de 2011, 77% da população da América Latina preferiu comprar produtos e serviços de empresas que trabalham de forma sustentável. Segundo esse estudo, 46% dos brasileiros estão dispostos a pagar mais por produtos sustentáveis. O anuário de 2012 da ABIPLA (Associação Brasileira das Indústrias de Produtos de Limpeza e Afins) mostrou que em 2011 o setor de detergentes para roupas obteve o maior consumo *per capita* dos últimos anos, apresentando em média um consumo de 4,8 quilos do produto quando comparado com 2010 em que a média foi de 4,5 quilos por indivíduo.

Nesse sentido, com o crescimento da utilização de enzimas em detergentes domésticos de circulação nacional, o objetivo deste trabalho foi analisar as atividades de amilase, protease e lipase em diferentes marcas de sabões domésticos comerciais.

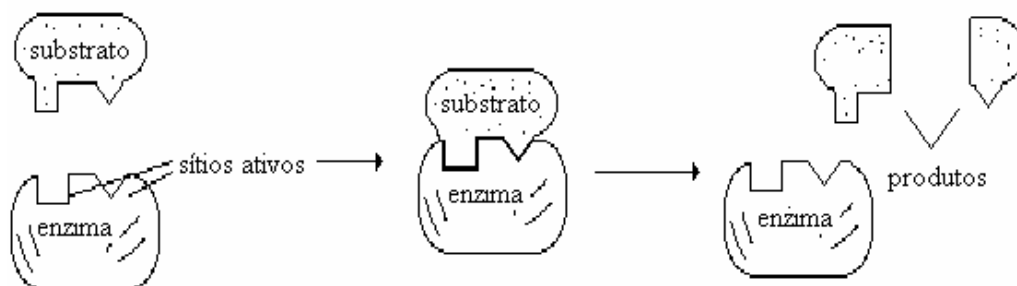
4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 ENZIMAS

As enzimas são recursos utilizados pelos sistemas biológicos para catálise de reações. Elas são extremamente específicas, tanto na reação química que irá catalisar quanto na escolha de seus reagentes, chamados de substratos (STRYER, 2014).

A atividade realizada por algumas enzimas requer a presença de certas moléculas, denominados cofatores. Os cofatores são subdivididos em dois grupos, metais e coenzimas. As coenzimas normalmente derivam de vitaminas, essas que podem se ligar fortemente ou frouxamente numa enzima, dependendo da função que a enzima irá executar (STRYER, 2014).

Enzimas possuem uma região denominada sítio ativo, que é a região que se liga ao substrato e/ou ao cofator. A interação entre a enzima e o substrato ocorre no sítio ativo, onde uma série de interações intermoleculares promove o estado de transição, que por sua vez diminui a energia livre de Gibbs, aumentando a velocidade da reação como demonstrado na Figura 1 (STRYER, 2014).



Fonte: PEREIRA (2008).

Figura 1 Esquema representativo da catálise enzimática.

Caso a função da enzima esteja diretamente ligada à remoção de impurezas em roupas, como a quebra de gordura, proteínas e açúcares, essas podem ser incorporadas à formulação de detergentes para roupas, denominados detergentes enzimáticos.

4.2 CLASSIFICAÇÃO DE ENZIMAS E FATORES QUE INFLUENCIAM NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As enzimas são divididas em grupos, por critérios estabelecidos de atividades e características catalíticas similares. A comissão de enzimas que estabelece esses parâmetros

(E.C./*EnzymeCommitition*) criou um código numérico para identificar todas as enzimas descritas. Foram estabelecidas pela União Internacional de Bioquímica (IUB) seis classes de enzimas, baseadas no tipo de reação catalisada (NC-IUBMB, 1992):

1. Oxidorredutases: Enzimas que têm característica de reações de transferência de elétrons, oxirredução.
2. Transferases: São enzimas que catalisam reações de transferências de grupos funcionais.
3. Hidrolases: São as enzimas que catalisam reações de hidrólise de ligação covalente.
4. Liases: catalisam a quebra de ligações covalentes e também a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico.
5. Isomerasas: São catalisadoras de reações do tipo de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos.
6. Ligases: São enzimas que catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas existentes.

Sabe-se que as enzimas necessitam de situações ideais para desenvolver sua atividade. Porém, sua atividade depende de fatores do meio onde a enzima se encontra para ocorrer uma atividade de máxima eficiência (BAILEY, 1986).

Esses fatores dependem da característica particular de cada enzima, como temperatura, pH e força iônica, entretanto, se esses fatores saírem das medidas ideais, pode causar uma queda na eficiência da enzima, podendo até desativar a atividade enzimática.

Além desses fatores, as enzimas necessitam de substratos para realizar a sua atividade, no entanto, para a eficiência máxima da atividade enzimática, necessita-se de uma concentração de substrato ideal, contudo, essas concentrações dependem de cada enzima e de sua característica (F.I.B, 2017).

4.3 TIPOS DE ENZIMAS APLICADAS A PRODUTO DE LIMPEZA

Dentre as amilases, existem dois tipos de enzimas, a termamyle a duramyl. A termamyl é uma enzima de origem bacteriana, sendo ativa em meios alcalinos e sob temperaturas elevadas (até 90°C). Essa enzima tem maior utilidade em formulações de detergentes destinados a lavagem de roupas (BRASIL, 2003).

No grupo das proteases, existem quatro tipos de enzimas, sendo elas: alcalase, savinase, ervelase e esperase. Alcalase é uma enzima que funciona em meios neutros ou pouco alcalinos. Tem seu grande uso na preparação de detergentes para lavagem de roupas delicadas (ALVAREZ, 1994). A savinase tem origem bacteriana, apresenta alta atividade em meios alcalinos e em condições medianas de temperaturas. Esta enzima é muito utilizada em detergentes para lavagem industrial de roupas (BRASIL, 2003). A everlase é uma variante da savinase, que possui modificação proteica para ter excelente capacidade de armazenamento de detergentes com lixívia. É uma enzima muito utilizada para lavagem industrial de roupas e para lavagem de louças (NOVOZYMES, 2003). A esperase é uma enzima de origem bacteriana apresentando alta eficiência catalítica em meios extremamente alcalinos e em altas temperaturas. É uma enzima mais aplicada em detergentes industriais (BRASIL, 2003).

Com relação às lipases, existem dois tipos, a lipolase e a lipolase ultra. A lipolase tem origem fúngica, sendo eficaz sob condições alcalinas e em uma ampla faixa de temperatura. Já a lipolase ultra possui atividade ótima em condições de baixas temperaturas, elevados valores de pH e também em meios com alta força iônica (BRASIL, 2003).

4.4 DETERGENTES ENZIMÁTICOS

Os detergentes enzimáticos possuem enzimas capazes de potencializar o seu poder de limpeza. As enzimas comumente utilizadas são capazes de promover a hidrólise (quebra da ligação) de proteínas, gorduras e carboidratos. No organismo humano o processo de digestão ocorre de forma análoga ao processo de limpeza dos detergentes enzimáticos, onde as enzimas decompõem as substâncias complexas em moléculas simples para facilitar a digestão, enquanto os detergentes enzimáticos fazem o mesmo para potencializar a limpeza. (ALVAREZ 1994).

Segundo a resolução normativa nº1/78 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) as enzimas devem ser utilizadas como aditivos ou coadjuvantes nos devidos produtos de limpeza. Dependendo da sujidade do tecido, enzimas específicas devem ser utilizadas, uma vez que cada enzima possui uma função e um substrato específico.

As amilases são enzimas que catalisam a hidrólise de glicogênio e da amilose e amilopectina do amido. Essas enzimas atuam especificamente na hidrólise de ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$. Elas têm função de remover manchas de amido, que não aderem

somente na fibra de algodão e celulose, podendo se ligar também às manchas onde formam um fino filme sob a camada superficial do tecido (NOVOZYMES 2003).

Proteases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. As proteases têm a função de remover proteínas como de sangue e ovo que tendem a aderir nas manchas sobre o tecido formando uma espécie de cola (filme) que dificulta a ação do detergente sobre essas manchas da superfície. As proteases têm a propriedade de degradar este filme e liberar a mancha (BRASIL, 2003).

Por um longo tempo as proteases foram consideradas ingredientes muito úteis nos detergentes modernos. Entretanto, amilases, celulases e lipases ganharam espaço, sendo também utilizadas em detergentes para roupas de uso doméstico e lavagem de equipamentos industriais (ARGUELLO et al., 2005).

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação éster entre o glicerol e ácidos graxos (Figura 2) e são comumente utilizadas em sabões para auxiliar na remoção de manchas de gordura de roupas e objetos. As lipases têm função de remover óleos e gorduras da superfície dos tecidos. Caso a remoção seja de baixo rendimento forma-se uma camada fina sob a superfície do tecido da mesma maneira que ocorre com a amilase e a protease. Com a utilização das propriedades da lipase esta camada pode ser removida (BRASIL, 2003).

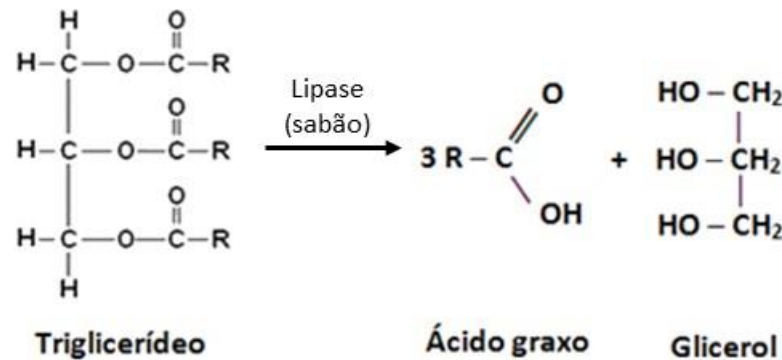


Figura 2: Esquema representativo da hidrólise da ligação éster catalisada pela lipase.

Esses detergentes enzimáticos são fáceis de serem manuseados, uma vez que são utilizados em temperaturas brandas de trabalho e baixa energia mecânica, além de serem pouco tóxicos, não corrosivos e terem maior estabilidade em comparação com os detergentes comuns (SEKHON e SANGHA, 2004).

Essa facilidade resultou em uma ampla utilização de detergentes enzimáticos em lavagens e estimulou a busca por enzimas geneticamente modificadas mais estáveis em ambientes alcalinos e na presença de agentes oxidantes. A faixa de temperatura de atuação

também se ampliou, mostrando-se mais eficientes do que enzimas não modificadas (MOSSOTI et al., 2003).

Com o desenvolvimento de enzimas recombinantes e capacidade de atuação em condições extremas, houve um aumento significativo nas suas aplicabilidades. Esses detergentes enzimáticos podem ser utilizados na área médica para limpeza de instrumentos, como agentes anticorrosivos e para limpeza de lentes, para limpeza na indústria de alimentos e laticínios, na limpeza de membranas osmóticas e também de utensílios de porcelana (SEKHON e SANGHA, 2004).

O tempo de limpeza desses detergentes varia em função da aplicação e já foi relatado na literatura que o tempo de limpeza de membranas osmóticas é bastante elevado (ARGUELLO et al., 2005; SMITH e BRADLEY, 1988; MUÑOZ-AGUADO et al, 1996).

5 METODOLOGIA DA PESQUISA

5.1 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

Na avaliação da atividade de amilase, protease e lipase em detergentes domésticos comerciais, foram utilizadas amostras de cinco marcas de sabões, adquiridos em supermercados locais e destinados à lavagem de roupas. Todas as marcas selecionadas mencionavam a presença de enzimas na formulação. Foram utilizadas três amostras de sabões em pó, uma de detergente líquido e uma de sabão em barra.

O detergente líquido foi utilizado diretamente nos sistemas reacionais para avaliação da atividade enzimática. Para a análise dos demais sabões (pó e barra) foram preparadas soluções aquosas nas concentrações 0,02 g/mL para sabões em pó e 0,01 g/mL para o sabão em barra.

5.2 ATIVIDADE AMIOLÍTICA

A determinação da atividade da amilase foi realizada de acordo com a Resolução ANVISA n° 1/78, com algumas modificações. O método utilizado foi baseado na determinação da atividade amilolítica pela quantificação de açúcares redutores liberados pela reação da quebra da ligação do amido catalisado por amilases. (Figura 3)

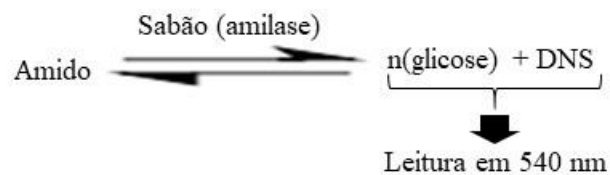


Figura 3: Esquema representativo da atividade amilolítica.

As reações foram efetuadas em sistemas contendo 300 µL de tampão citrato-fosfato 0,05 mol/L, pH 6,0, 200 µL de solução de amido 1% (p/v) e 100 µL de amostra de sabão. Na sequência as reações foram incubadas a 37°C por 30 minutos, seguido pela adição de 1,0 mL de solução de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) e aquecimento a 100°C por cinco minutos. Após, foi adicionado aos sistemas reacionais 5,0 mL de água destilada e as absorbâncias dessas reações foram analisadas espectrofotometricamente em comprimento de

onda de 540 nm. Foi construída uma curva padrão de glicose contendo as seguintes concentrações: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 140 $\mu\text{mol/L}$.

Como branco foram preparados sistemas reacionais como descritos acima, nos quais o volume de amostra e o volume de substrato foram substituídos por tampão.

A atividade enzimática foi representada por unidade de atividade amilolítica por mL por minuto (UA/mL/min). Essa unidade é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de açúcares redutores por mL por minuto, nas condições descritas.

5.3 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A determinação da atividade proteolítica foi realizada de acordo com a Resolução ANVISA nº 1/78, com algumas modificações. O método se baseia na determinação da atividade proteolítica pela quantificação do grupamento azo (-N=N-) liberado pela hidrólise do substrato cromogênico azocaseína. (Figura 4)

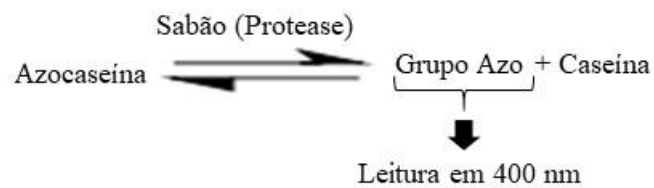


Figura 4: Esquema representativo da atividade proteolítica.

As reações foram efetuadas em sistemas reacionais contendo 200 μL de tampão tris-HCl 0,05 mol/L e 100 μL de substrato de azocaseína 2% (p/v), seguido pela incubação a 40 °C. Na sequência foram adicionados 100 μL de amostra de sabão e os sistemas foram incubados a 40°C por 15 minutos. Decorrido o tempo de incubação, as reações foram paradas pela adição de 800 μL de ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v). Os tubos foram então centrifugados a 6000 \times g por cinco minutos e o sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro a 400 nm.

Como branco foram preparados sistemas reacionais contendo todos os componentes descritos acima, com exceção das amostras dos sabões, e tratados nas mesmas condições de temperatura e tempo descritos.

A atividade enzimática foi representada pela unidade de atividade proteolítica (UP/mL/min), definida como a quantidade de enzima necessária para produzir uma variação de uma unidade de densidade óptica (DO) em uma cubeta de 1 cm de caminho óptico por mL de amostra por minuto, sob condições padrões.

5.4 ATIVIDADE LIPÁSICA

A atividade lipásica foi determinada utilizando *p*-nitrofenilpalmitato 3 mg/mL em isopropanol como substrato, onde a enzima é capaz de hidrolisar a ligação éster do substrato, liberando *p*-nitrofenol, o qual foi identificado em espectrofotômetro. Para o ensaio foram utilizados sistemas reacionais contendo 900 μ L de emulsão e 100 μ L de amostra de sabões. A emulsão foi preparada a partir de 1 mL de substrato e 9 mL de solução emulsionante (2 g de Triton X-100, 0,5 g de goma arábica e 450 mL de tampão tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0). Os sistemas reacionais foram incubados a 40 °C por trinta minutos, seguido pela leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 400 nm. (Figura 5)

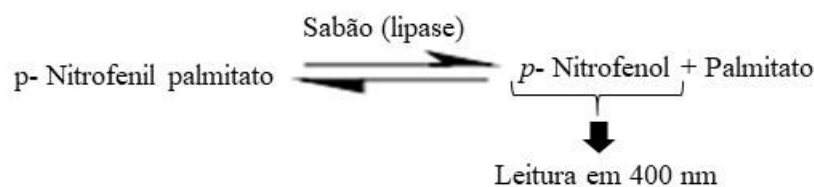


Figura 5: Esquema representativo da atividade lipásica.

Como branco foram preparados sistemas como os descritos acima, porém os mesmos foram lidos em espectrofotômetro imediatamente após a preparação.

A atividade lipásica foi expressa em unidade de atividade lipásica por mL por minuto (UL/mL/min), onde uma unidade lipásica equivale a 1 μ mol de *p*-nitrofenol liberado por mL por minuto.

5.5 ANÁLISE QUALITATIVA

Para análise qualitativa, a atividade amilolítica foi avaliada pela adição dos sabões (A e B – 1g, C – 1 ml (solução 0,01 g/ml) e D – 1 ml) em preparados de pudim (30 ml) e a atividade proteolítica pela adição dos sabões em gelatina comestível (30 ml). Para avaliar a atividade lipásica, soluções aquosas (como preparadas para os ensaios quantitativos) dos sabões foram adicionadas à creme de leite (15 ml) na proporção 1:1 (v/v), contendo três gotas de indicador fenolftaleína. A análise foi baseada na aparência visual da consistência dos preparados de pudim e gelatina e na mudança da coloração rosa para incolor do creme de leite como indicativo da hidrólise dos lipídios e liberação de ácidos graxos.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Três experimentos independentes e em triplicata foram efetuados para cada atividade enzimática testada e análise de variância pelo teste ANOVA, com α de 0,05 utilizando o aplicativo Excel[®]. Para comparar as marcas entre si e verificar quais eram estatisticamente diferentes foi utilizado o teste de Tukey com o software Past 3.x (HAMMER, HARPER e RYAN, 2001).

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A avaliação das atividades enzimáticas foi realizada de acordo com a normativa da ANVISA nº 1/78, com algumas modificações.

A legislação brasileira é quem define as características de composição de detergentes e demais produtos de higienização e limpeza, e considera as enzimas coadjuvantes ou aditivos que complementam a formulação, sendo admitidas apenas as amilases, as proteases e as lipases nestes produtos (ANVISA, 1978). Apesar de todas as resoluções e orientações normativas acerca da adição de enzimas em detergentes domésticos nacionais, observa-se nos produtos de limpeza comerciais de circulação nacional apenas a informação da presença de enzimas, porém sem a especificação do tipo de enzima adicionada e atividade enzimática mínima.

Desta forma, quatro marcas de sabões, comercializados para lavagem de roupas foram analisados quanto a atividade de amilase, protease e lipase (Figura 6).

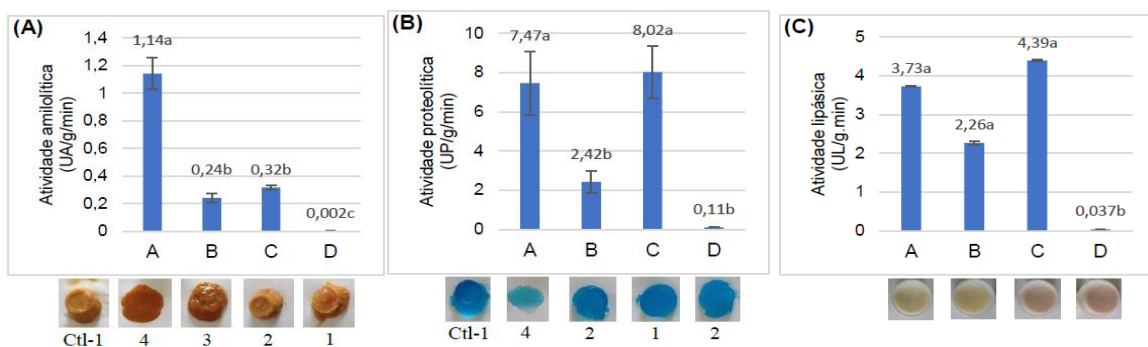
Os resultados indicaram que a marca A apresentou atividade amilolítica superior às demais marcas (Figura 6A), evidenciado pela ausência de consistência do pudim no ensaio qualitativo. Com relação às atividades proteolíticas e lipásica foi observada que as marcas A e C apresentaram atividades similares e consideravelmente superiores às demais marcas (Figura 6B e C). Entretanto, não foi possível comparar a marca C com as demais, uma vez que se trata de um sabão em barra, enquanto que as marcas A e B são sabões em pó e a marca D sabão líquido. Sabões em pó e líquido são destinados para lavagem de roupas que passam por uma etapa de molho no processo de lavagem, onde as enzimas atuam, enquanto que o sabão em barra é destinado para lavagem local e geralmente sem molho, onde o tempo de contato entre enzima e substrato é menor e, portanto requer maior atividade enzimática.

Os ensaios qualitativos de atividade proteolítica mostraram que a marca A não permitiu a gelatina comestível solidificar (Figura 6B), sugerindo a degradação do colágeno. O ensaio de atividade lipásica mostrou que as marcas A e B apresentaram maiores atividade nos ensaios qualitativos, uma vez que a solução se tornou incolor na presença de fenolftaleína, surgindo a hidrólise dos lipídios e liberação de ácidos graxos em solução, acidificando o meio e alterando a coloração (Figura 6C).

Nos ensaios qualitativos a marca C não apresentou atividade aparente pois foi utilizada em uma concentração 250 vezes menor em comparação aos demais sabões testados, devido à necessidade de preparação de uma solução aquosa do sabão em barra.

Em um trabalho similar de avaliação de detergentes enzimáticos comerciais as atividades enzimáticas variaram consideravelmente entre as marcas, explicitando a necessidade de uma reformulação dos rótulos dos detergentes enzimáticos, permitindo assim uma comparação precisa entre diferentes produtos (MITIDIERI et al., 2002).

Figura 6 – Atividade amilolítica (A), proteolítica (B) e lipásica (C) em sabões enzimáticos comerciais.



Nos gráficos são apresentadas as médias seguidas de letras. Letras iguais – não há diferenças significativa ao nível de significância de 5%. UA/g/min., quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de açúcar redutor por grama por minuto. UP/g/min., quantidade de enzima necessária para produzir uma variação de uma unidade de densidade óptica por grama por minuto. UL/g/min., 1 μ mol de *p*-nitrofenol liberado por grama por minuto. Para a marca D, as atividades são representadas por Unidade Enzimática por ml por minuto, por se tratar de sabão líquido. Abaixo dos gráficos são apresentadas as imagens dos testes qualitativos de (A) consistência de pudim, (B) consistência de gelatina e (C) avaliação da cor na presença de fenolftaleína. Os números abaixo indicam uma escala

visual de consistência, onde 1 é mais consistente, semelhante ao controle (Ctl) e 4 é o de consistência líquida.

As marcas testadas foram avaliadas quanto a relação atividade catalítica/preço (Tabela 1), com base em uma média de preços das marcas em três redes de supermercados da cidade de Joinville-SC.

Tabela 1 - Relação atividade enzimática de amilase, protease e lipase em função do valor de mercado das marcas analisadas.

Marca	Relação Atividade Catalítica / Preço (R\$)		
	Amilase	Protease	Lipase
A	97,4	638,3	318,7
B	49,7	501,5	468,2
C	5,2	130,0	71,2
D	0,7	38,0	12,8

Com relação à atividade amilolítica a relação atividade/preço da marca A foi aproximadamente o dobro da marca B, com as demais apresentando valores aproximadamente 95% menores. Com relação à atividade proteolítica, a marca A também apresentou uma relação maior, seguido das marcas B, C e D, com valores aproximadamente 22%, 80% e 95% menores, respectivamente. Para a atividade lipásica, a marca B apresentou melhor relação atividade/preço, seguida das marcas A, C e D, com valores aproximadamente 32%, 85% e 97% menores em comparação ao B, respectivamente.

A grande variação na atividade enzimática observada em sabões têxteis comerciais e a falta de clareza nas informações presentes em rótulos, principalmente quanto aos tipos de enzimas adicionadas, bem como as atividades mínimas, revelam a necessidade de modernização da regulamentação e fiscalização para melhorar o acesso à informação para o consumidor.

7 CONCLUSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as atividades enzimáticas (amilolítica, proteolítica e lipásica) em sabões comerciais, uma vez que as rotulagens dos produtos comercializados no Brasil trazem poucas informações com relação às enzimas e suas atividades. Nesse sentido, determinou-se que ambas as marcas analisadas apresentaram atividades variadas das três enzimas testadas e que a marca A apresentou valores superiores e melhor relação atividade/preço na maioria das enzimas, enquanto que a marca D apresentou os menores valores em comparação às demais marcas testadas.

8 REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, F.E.; Detergentes Enzimáticos. Porto Alegre, p-15. 1994.
- ANVISA. Constituição (1978). Resolução nº 1, de 27 de novembro de 1978. **Normas A Serem Obedecidas Pelos Detergentes e Seus Congêneres.**
- ANVISA. Constituição (2012). Resolução nº 55, de 14 de novembro de 2012. **Detergentes Enzimáticos de Uso Restrito em Estabelecimentos de Assistência à Saúde Com Indicação Para Limpeza de Dispositivos Médicos.**
- ARGUELLO, M.A.; ALVAREZ, S.; RIERA, F.A., ALVAREZ, R. Utilization of enzymatic detergents to clean inorganic membranes fouled by whey proteins. **Separation and Purification Technology** 41 (2005) p.147–154.
- BAILEY, J.E. and D. F. O, Biochemical engineering fundamentals. New York, NY: McGraw-Hill Book Co., 1986.
- BELO, M.F.R.F.B.; SOUZA, A.L.F. Estudo cinético da enzima catalase (EC 1.11. 1.6) de extrato bruto de batata doce (*Ipomoea batatas*). **Scientia Plena**, v. 12, n. 7, 2016.
- BRASIL, G.A.R.; **Enzimas em produtos de limpeza.** Brasília. 2003. 32 f. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas). – Setor de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências da Saúde, Centro Universitário de Brasília (UNICEUB), Brasília, 2003.
- COELHO, M.A.Z et al. **Tecnologia enzimática.** Editora EPUB, 2008.
- TAGLIARI, C. V. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de cafeína e teofilina demetilases por *Rhizopus delemar* em fermentação no estado sólido utilizando casca de café como substrato.** 2003 Tese (Doutorado em Engenharia Química). Departamento de Processos Químicos, Universidade Estadual de Campinas, 2003.
- F.I.B; Enzimas: Natureza e ação nos Alimentos. **FOOD INGREDIENTS BRASIL**, São Paulo, n. 16, jan-mar. 2011. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/166.pdf>>. Acesso em: 07 mai. 2017.
- HAMMER, Ø., HaARPER, D.A.T., RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9p, 2001.
- MENDES, C.M. **Avaliação da estabilidade de proteases de intestino de Tilápia do Nilo como aditivo para a indústria de detergentes.** 2007. 57f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.
- MOSSOTTI, R.; INNOCENTI, R.; GALANTE, Y.M. Estudos e propriedades da lã tratada com proteases. **Química Têxtil** nº 71/jun.03 p. 6-16.
- MOTTA, V.T. Bioquímica clínica: princípios e interpretações. In: Vol. 9, p.91-120, 2000.

MUÑOZ-AGUADO, M.J.; WILEY, D.E.; FANE, A.G. Enzymatic and detergent cleaning of a polysulfone ultrafiltration membrane fouled with BSA and whey. **Journal of Membrane Science** 117 (1996) p. 175-187.

NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology). Enzyme Nomenclature, 1992. Disponível em <<http://www.sbcqmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>> Acesso em 02/11/2017.

NOVOZYMES. Enzymes. Disponível em: <<http://www.novozymes.com>> Acesso em: 13 de Agosto de 2003.

PEREIRA, F. M. **Modelagem e simulação do núcleo morto em partículas catalíticas contendo enzimas imobilizadas e suas consequências no projeto e operação de reatores enzimáticos**. 2008 Tese (Doutorado em Biotecnologia industrial). Universidade de São Paulo, 2008.

SEKHON, B.S.; SANGHA, M.K.; Detergents - Zeolites and Enzymes Excel Cleaning Power. **Resonance** – August 2004 p.35-45.

STRYER, L. Bioquímica. 7. Ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

ZIMMER, K.R.; BORRÉ, G.L.; TRENTIN, D.S.; JÚNIOR, C.W.; FRASSON, A.P.; GRAEFF, A.A.; GOMES, P.; MACEDO, A.J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 123-137, 2009.