

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA AMILASE EM DETERGENTES EM PÓ - UMA AULA PRÁTICA DE ENZIMOLOGIA

(The amylase activity determination in usual powder detergents — a practical class of enzymology)

AUTORES - Maria Teresa Pedrosa Silva Clerici¹, Armino Antonio Alves², Roberval Serafim da Silva³

AFILIAÇÃO - ¹ – Pós-doutoranda- DTA-FEA- Unicamp

² - Professor de Bioquímica da UNIARARAS - Araras - SP.

³ - Técnico especializado - PUC-Campinas -SP.

Endereço: mtclerici@uol.com.br.

Abstract

The aim of our work is to present a practical class that assesses the amylase activity in usual powder detergents. This practical class allows the discussion of basic concepts in enzymology, like enzymatic activity and suitable temperature and pH for the maximal enzyme activity. It makes possible, also, the argument about the use of enzymes in usual industrial products and the essential precautions to avoid undesired effects, like contact dermatitis.

Resumo

Neste trabalho propomos um protocolo de aula prática para medir a atividade enzimática das amilases em detergentes em pó de uso comum. Esta aula permite a discussão de conceitos básicos de enzimologia, como atividade enzimática, temperatura e pH adequados para se atingir a atividade ótima. Além disso, permite discutir a utilização de enzimas nos produtos industriais de uso comum e os cuidados que tem de ser tomados para evitar efeitos indesejáveis como a dermatite de contacto.

Introdução

Neste trabalho apresentamos uma aula prática utilizada por nós na disciplina de Biotecnologia nos cursos das instituições onde trabalhamos. Esta aula prática poderá ser utilizada em disciplinas de Bioquímica Básica, para trabalhar conhecimentos teóricos de enzimologia, como atividade enzimática, pH ótimo e temperatura ótima de trabalho das enzimas, usando-se como solução enzimática um material de uso do dia-a-dia, bastante acessível e barato. Pode ser utilizada em disciplinas mais técnicas como Biotecnologia, por

exemplo, porque permite abordagens que vão desde o encapsulamento de enzimas à utilização correta dos produtos que contém enzimas, visando evitar dermatites de contacto.

Referencial Teórico:

Os principais tipos de enzimas utilizadas na indústria de detergentes incluem: a) amilases, degradam amido e outros glicídios de carboidratos; b) proteases, degradam ligações peptídicas; c) lipases, degradam lipídeos; d) celulases, degradam celulose (1). Os sabões em pó em sua maioria são adicionados de enzimas que vão degradar a matéria orgânica, de acordo com sua afinidade pelo substrato, presente nas manchas das roupas.

Os principais benefícios do uso de enzimas são:

a) a remoção da mancha ocorre de forma suave: sem alterações bruscas de pH, temperatura e agitação.

b) O processo é rápido, mas deve ser de acordo com o tempo de molho descrito na caixa do sabão em pó.

c) Provocam menor dano as fibras do tecido, sendo que alguns sabões contém celulase, que visa amaciar as fibras do tecido.

d) Enzimas são biodegradáveis, logo não agredem o meio ambiente

Ao analisar rótulos das caixas de sabão em pó foi verificado que existe uma ausência de informações necessárias para o uso de enzimas pelo consumidor, que são:

a) A maioria das caixas só traz a informação: contém enzimas, sem descrever quais enzimas contem e com qual atividade.

b) O rótulo não informa as condições necessárias para manipulação do sabão em pó, pois deve-se fazer uso de luvas, para evitar dermatites de contato.

c) O fato de lavar a roupa diretamente na máquina, sem deixar o tempo de molho, pode levar a desnaturação da enzima e, portanto, sem ação da enzima na mancha.

d) Como muitas máquinas de lavar possuem temperaturas que variam da temperatura ambiente até 90°C, a temperatura ótima de atividade enzimática deve ser recomendada.

e) Faz-se necessário esclarecer como deve ser feito o tratamento de uma dermatite provocada por ação das enzimas presentes no sabão, ou seja quais os recursos necessários para paralisar a atividade das enzimas durante contato com olhos, mucosas etc.

f) Uma roupa lavada manualmente pode provocar dermatites na pessoa que lava a roupa e caso esta roupa não seja passada a ferro (para desnaturar enzimas residuais) pode provocar reações alérgicas no usuário da roupa, fato que se agrava quando o usuário for um bebê, criança, um paciente acamado etc.

g) O processo de enxágüe da roupa deve garantir que toda a enzima foi desnaturada, pois o hábito de passar a roupa vem sendo abandonado à medida que se aumenta o uso de tecidos sintéticos.

Segundo Wiseman (2), as enzimas amilases contidas nos detergentes são instáveis em presença de cloro, presente em muitos alvejantes, e devido a problemas alérgicos que se manifestaram, na década de 1970, nos trabalhadores e consumidores de detergentes enzimáticos, as enzimas são microencapsuladas, quando o produto for em pó, para evitar inalação e contato direto com enzimas.

Portanto sabões em pó contendo enzimas, não devem ser usados para lavagem manual de roupas, fato comum em países subdesenvolvidos, onde ainda existem as profissões de empregada doméstica e da lavadeira, e nem sempre existe a presença da máquina de lavar roupa.

No trabalho realizado por Mitidieri et al (2) analisado a atividade enzimática em sabão em pó: as enzimas amilases, proteases e lipases foram avaliadas e houve uma grande variação de atividade enzimática em marcas distintas de sabão em pó, mostrando a ausência de regulamentação.

Neste trabalho está sendo proposta uma aula prática para verificar a ação da amilase em detergentes, fazendo-se adaptações e modificações do método descrito por Mitidieri et al (2).

A amilase é usada em detergentes visando remover resíduos de amidos e féculas, porém o detergente deve ser livre de compostos clorados.

Objetivo da Aula

Determinar a atividade da enzima amilase presente no detergente em pó e desenvolver conceitos de enzimologia como atividade enzimática, especificidade, tempo de incubação, pH e temperatura ideais.

Material

a) Reagentes

- Amido de milho solúvel a 5%(m/v), previamente gelatinizado (cozido até desintegração dos grânulos) em água destilada, resfriado e depois colocado em balão volumétrico e completado o volume para quantidade suficiente para 100mL (preparo recente). Atenção: não usar o amido solúvel sem gelatinização.
- Tampão citrato de sódio, 0,01 M, pH 6,0.
- Reagente DNS: contém 3,53g de ácido 3,5-dinitrossalicílico e 6,0g de hidróxido de sódio em 472mL de água destilada, acrescido de 102g de tartarato duplo de sódio e potássio, 2,53mL de fenol 5% e 2,76g de metabissulfito de sódio.
- solução de detergente enzimático a 2%.

b) Vidrarias

- Pipetas volumétricas de 1, 2 e 3 ml
- Tubos de ensaio de 20ml
- Banho maria a 42°.C
- Bico de bunsen, béquer com água a 96°.C
- Espectrofotômetro a 550nm

Métodos:

a) Preparar os tubos de ensaios conforme o esquema descrito na Tabela 1.

b) Fazer a leitura em 550nm, após as adições e os tempos de incubação descritos abaixo:

Tabela 1: Método de preparo do experimento

Reagentes	Tubo 1	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
Detergente 2%	1mL	1mL	1mL	1mL	1 mL
Tampão citrato	3mL	3mL	3mL	3mL	3mL
Amido solúvel	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml
Incubação (42°.C)	O	5min	15min	30min	45min
Reagente DNS	1,5mL	1,5mL	1,5mL	1,5mL	1,5mL
Incubação (96°.C)	5min	5min	5min	5min	5min
	Resfriar	Resfriar	Resfriar	Resfriar	Resfriar
H ₂ O	14mL	14mL	14mL	14mL	14mL

Roteiro para resultados e discussão

a) Elaborar uma tabela com os resultados obtidos, conforme modelo descrito na tabela 2.

b) Fazer um gráfico de tempo x absorvância.

c) Discutir a eficácia do uso da amilase em sabões em pó.

Tabela 2. Avaliação da atividade da amilase em função da absorvância e do tempo de contato com o substrato de amido solúvel.

Tubo	Abs. 550 nm
01	
02	
03	
04	
05	
06	

Sugestões para relatório e novas aulas práticas

Cada grupo de aluno, pode realizar as análises com amostras diferentes de sabões em pó, e após os resultados obtidos para vários produtos, pode ser feito um estudo comparativo da atividade enzimática da amilase.

Avaliar o rótulo do sabão em pó analisado, utilizando os conhecimentos de enzimologia e fazer as devidas correções no rótulo.

Conclusão

O aluno deve verificar se o objetivo da aula foi alcançado, ou seja se as análises realizadas em aula prática, foram capazes de demonstrar a atividade da amilase no sabão em pó.

Referências bibliográficas

1. BON, E.P.S. A tecnologia enzimática no Brasil. **ENZITEC 95**, v. 1: 9-14,1995.
2. WISEMAN, A. **Manual de Biotecnología de los Enzimas**. Ed. Acribia. Zaragoza. 1985,444p.

3. MITIDIERI, S. ; MARTINELLI, A.H.S., CAMASSOLA, S.; MENGUER, P.K.; SCBRANCK, A.&VAINSTEIN, M.H. Detergentes biológicos biodegradáveis:avaliação das formulações do mercado. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** - nº 26-p. 56-60, maio/junho, 2002.