



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UniCEUB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – FACS

ENZIMAS EM PRODUTOS DE LIMPEZA

Getúlio Amaral Rosa Brasil

Brasília -2003

Centro Universitário de Brasília – UniCEUB

Faculdade de Ciências da Saúde – FACS

Bacharelado em Ciências Biológicas

ENZIMAS EM PRODUTOS DE LIMPEZA

Getúlio Amaral Rosa Brasil

Monografia apresentada como requisito para a
conclusão do curso de Biologia do Centro
Universitário de Brasília.

Orientação: Marco Antônio Abla – Gerência Geral de Saneantes da
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa;
Claúdio Henrique Cerri e Silva - UniCEUB

Brasília –2º semestre / 2003

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Getúlio Torres Brasil & Delfina Amaral Rosa Brasil, e a todos que me ajudaram na realização deste.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por terem me apoiado. Aos meus amigos Mateus Oliveira Araújo e Denise Barbosa Silva que me guiaram na realização deste. Deus que me levou por caminhos corretos; ao Marco Antônio Abla que me deu força e ajuda técnica para a finalização.

RESUMO

As substâncias biológicas que têm a propriedade de promover transformações específicas em outras substâncias biológicas são chamadas enzimas. O nome de cada enzima está associado ao substrato ou substância sobre a qual ela age. O uso dessas em produtos de limpeza vem tendo crescente utilização no Brasil e no mundo nos últimos anos devido ao fato de que estas têm especificidade e eficácia em remoção de matéria orgânica, levam a um menor custeio as fábricas, pois, economizam energia e são biodegradáveis, tendo menos toxicidade aos consumidores e, por consequência, ao meio ambiente. Em detergentes iônicos, pode-se observar uma estrutura básica, composta por duas partes onde uma se liga às moléculas de água e outra que se liga às moléculas da substância a ser diluída, como a matéria orgânica, fazendo uma ponte entre as substâncias e as moléculas de água, permitindo que àqueles sejam dissolvidas. Enquanto por um lado esse tipo de detergente é potente, pois possui muito mais íons livres, por outro lado, estes acabam por reagir de forma inespecífica com outras substâncias, compostas por matéria orgânica ou não. Então surge o princípio ativo inovador em produtos de limpeza, as enzimas, e assim, os produtos enzimáticos como, por exemplo, um detergente enzimático. Estes nada mais são do que produtos formulados com enzimas ativadas de alta qualidade que fazem um processo semelhante ao da digestão, porém de forma muito mais rápida. As enzimas utilizadas nesses produtos são as proteases, as amilases, as lipases e as celulasas que são obtidas a partir da engenharia genética, tendo como matéria-prima as próprias bactérias, fungos e outros microrganismos. Muita eficácia, biodegradáveis e de baixo custo são os principais fatores que levaram as indústrias à utilização desse novo tipo de tecnologia.

Palavras-chaves: Enzima, substrato, catálise, detergentes e biodegradabilidade.

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	1
2. O que são enzimas?	3
3. Natureza e estrutura enzimática	5
4. Nomenclatura e classificação da enzimas	7
5. Cinética da catálise enzimática	10
6. Mecanismos da ação enzimática	13
7. Técnicas empregadas no estudo das enzimas	16
8. Análises de reações com alta velocidade	17
9. Análise quantitativa da atividade enzimática	18
10. Purificação enzimática	18
11. Detergentes comuns	20
12. Detergentes enzimáticos	21
13. Tipos de enzimas aplicadas em produtos de limpeza	23
14. Conclusão	25
15. Referências Bibliográficas	26

1. INTRODUÇÃO

O uso de enzimas em produtos de limpeza vem tendo uma crescente utilização no Brasil e no mundo nos últimos anos. Tal crescimento se deve à busca por uma maior especificidade e eficácia, aliada a uma menor toxicidade aos consumidores e ao meio ambiente. Este trabalho visa discutir os aspectos técnicos para algumas preparações enzimáticas autorizadas pela legislação sanitária vigente no Brasil e as perspectivas futuras, a nível mundial.

Sabemos hoje que as enzimas representam a maior classe de proteínas, e que todas são classificadas como proteínas globulares, com mais de 2 mil espécies diferentes, sendo que cada uma delas catalisa uma reação química específica.

Seu poder de catálise é extraordinário, o que as tornam essenciais à todos os processos biológicos. As enzimas participam de todas as reações químicas que ocorrem nas células, acelerando-as sobremaneira sem, contudo, sofrer qualquer alteração ou dano. Um bom exemplo é a oxidação do açúcar que ao simples contato com o ar, sofre alterações mínimas no entanto, quando dentro da célula, pela ação catalisadora das enzimas, oxida-se de maneira muito rápida para produzir energia necessária ao metabolismo.

Como mencionado anteriormente, a capacidade catalítica das enzimas é admirável, assim uma unidade de enzima chega a catalisar de 10.000 a 1.000.000 unidades de determinado substrato. Um exemplo é a pepsina que digere 50.000 vezes seu peso de clara de ovo cozida em 2 horas. A velocidade de ação das enzimas também surpreende; a catalase, por exemplo, reduz por minuto 5 milhões de moléculas de peróxido de hidrogênio a água e oxigênio. A ação catalisadora das enzimas é otimizada de acordo com a temperatura e pH. A pepsina age num pH ácido (1,2 a 1,8), devido ao HCl do estômago; e a tripsina, num pH levemente alcalino (6,8 a 7,5), pois age no intestino (SEGEL 1979).

Hoje em dia, as enzimas são amplamente usadas no processamento de alimentos e em muitos outros ramos da indústria manufatureira. Muitos produtos alimentícios consumidos diariamente, entre os quais o pão e queijo, são feitos com a

colaboração deste tipo especial de proteína. Como suplemento de ração animal, desempenham importante papel por reduzirem a produção de resíduos. Também são utilizadas em muitas atividades industriais, como na indústria de produtos de limpeza, no processamento da polpa e do papel, na preparação têxtil e em aplicações médicas onde, com frequência, substituem compostos ou processos químicos (NOVOZYMES 2003).

As enzimas são extraídas de microrganismos, plantas ou tecidos animais. A produção destas pode ser aumentada pela transferência das informações genéticas para um microrganismo hospedeiro, cultivado sob as melhores condições, conhecido por meio de técnicas de DNA recombinante. As enzimas ajudam a proteger o meio ambiente, reduzindo a presença de produtos residuais e a necessidade do uso de produtos químicos mais agressivos (NOVOZYMES 2003).

Vários fatores têm desencadeado uma busca por enzimas no setor industrial dentre os quais: desenvolvimento de processos industriais mais econômicos, redução do consumo energético, especificidade e redução de riscos ocupacionais e ambientais, dentre outros. Atualmente as enzimas podem substituir muitos produtos químicos e tornar a produção segura e, ambientalmente, amigável.

2. O QUE SÃO ENZIMAS?

O termo é derivado de "en" = dentro e "zima" = levedura. Algumas enzimas consistem em duas partes – uma porção proteica, chamada apoenzima, e uma porção não proteica, chamada cofator. O cofator pode ser um íon metálico (como ferro, magnésio, zinco ou cálcio) e uma molécula orgânica, chamada coenzima, que muitas vezes deriva de vitaminas. Em conjunto, a apoenzima e o cofator formam a holoenzima, ou seja a enzima completa. Os nomes das enzimas, geralmente, terminam com o sufixo –ase. O nome de cada enzima está associado ao substrato ou substância sobre a qual ela age. Assim adiciona-se o sufixo *ase* ao substrato ou substância específicos. Por exemplo: a enzima que divide a lactose chama-se *lactase*; no caso da uréia, *urease*.

Todas as enzimas podem ser classificadas em função do tipo de reação química que catalisam. Por exemplo, as oxidases adicionam oxigênio, as cinases adicionam fosfato, as desidrogenases removem hidrogênio, as ATPases decompõem o ATP, as anidrases removem água, as proteases decompõem as proteínas e as lipases decompõem os lipídios (TORTORA & GRABOWSKI 2000).

Também são responsáveis pela catálise das reações químicas que ocorrem no interior do ser vivo. Catalisam reações selecionadas, fazendo-o com grande eficiência e com controles intrínsecos. As enzimas possuem três características fundamentais:

- ✓ São extremamente específicas, se ligando apenas a substratos específicos. Em outros casos, é considerado que parte da enzima que cataliza a reação, chamada sítio ativo, “ajusta-se” ao substrato, como uma chave se ajusta à fechadura. Em outros casos, o sítio ativo modifica sua forma para se ajustar precisamente em torno do substrato, uma vez este tenha chegado ao sítio ativo. Isso é conhecido como ajuste induzido (*induced fit*). Das mais de 1.000 enzimas conhecidas, encontradas em seu corpo, cada uma tem forma tridimensional característica, como configuração específica de sua superfície, o que lhes permite reconhecer e se ligar a determinadas substratos. Não

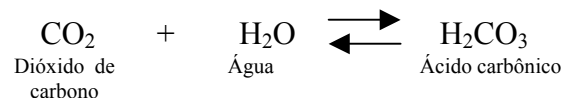
apenas uma enzima é relacionada com substrato específico, mas, também, ela catalisa reação igualmente específica. Dentro do grande número de moléculas diferentes, encontradas nas células, a enzima deve reconhecer seu substrato correto e, em seguida, decompô-lo ou mesclá-lo com outro substrato, para formar um ou mais produtos específicos.

- ✓ São muito eficientes a ponto de que, em condições ótimas, são capazes de catalisar reações, com intensidade 100 milhões a 10 bilhões de vezes mais rápida que a de reações semelhantes, ocorrendo sem enzimas (TORTORA & GRABOWSKI 2000). Para se fazer uma idéia da eficiência de uma enzima, basta compararmos a hidrólise de proteínas no laboratório, com a mesma hidrólise no estômago. No laboratório, para se conseguir a hidrólise total de um grama de carne, deve ser colocada em contato com uma solução de um ácido forte e fervida durante 24 horas. No estômago, à temperatura de 38°C, a hidrólise ocorre em 4 horas. Isto deve-se à presença no suco gástrico de uma enzima, a pepsina. O número de moléculas de substrato que uma só enzima é capaz de converter em moléculas do produto, em um segundo, fica, geralmente, entre 1 e 10.000, podendo atingir até 600.000 (MANSO 1977).
- ✓ Estão sujeitas a diversos controles celulares. Suas velocidades de síntese e suas concentrações, em determinado momento, estão sob o controle do genes celulares. As substâncias, no interior das células, podem aumentar ou inibir a atividade de determinada enzima. Muitas enzimas apresentam formas ativas e inativas, nas células; a velocidade (ou intensidade) com que a forma inativa se torna ativa, ou vice-versa, é determinada pelo ambiente químico, dentro da célula.

As enzimas diminuem a energia de ativação de uma reação química por baixarem a “aleatoriedade” das colisões entre as moléculas. Ajudam também a aproximar os substratos, na orientação adequada, de modo que a reação possa ocorrer, atuando da seguinte forma:

- ✓ Os substratos entram em contato com o sítio ativo da superfície da molécula da enzima, formando um composto intermediário temporário, chamado complexo enzima-substrato.
- ✓ As moléculas de substrato são transformadas pelo rearranjo dos átomos existentes, pela decomposição da molécula do substrato ou pela combinação de diversas moléculas de substrato, nos produtos da reação.
- ✓ Após a reação ter sido completada, com os produtos da reação se afastando da enzima, a enzima inalterada fica livre para se ligar a outras moléculas de substrato.

Em alguns casos, uma só enzima pode catalisar uma reação reversível nas duas direções, dependendo da abundância relativa dos substratos e produtos. Por exemplo, a enzima *anidrase carbônica* catalisa a seguinte reação reversível:



Durante o exercício, quando é produzido mais CO₂, que é liberado para o sangue, a reação ocorre no sentido do aumento do teor de ácido carbônico no sangue. Então, quando é exalado o CO₂, seu teor sangüíneo baixa e a reação ocorre no sentido inverso, decompondo o ácido carbônico em CO₂ e H₂O (TORTORA & GRABOWSKI 2000) .

3. NATUREZA E ESTRUTURA ENZIMÁTICA

As enzimas são proteínas, no entanto, temos também atividade catalítica em RNA, as chamadas ribozimas. As proteínas, como um todo, ocupam um papel de destaque na dinâmica e estruturação dos organismos vivos. As ligações peptídicas

que ligam cadeias lineares de aminoácidos caracterizam a estrutura primária das proteínas. Considerando-se apenas a estrutura primária de uma proteína, a molécula deveria ser muito extensa e muito fina. Porém, muitas enzimas apresentam uma forma globosa em vez da fina fita linear, evidenciando estruturas de ordem superior, conhecidas como estrutura secundária, terciária e quaternária, que ocorrem em função de interações intrínsecas entre os blocos constituintes da molécula (BEYNOM & BOND 1989).

A estrutura secundária de uma proteína é caracterizada pela formação de alfa hélices e folhas beta que são conformações resultantes das interações acima mencionadas. Somente esta estrutura adicional explica como uma molécula de proteína pode ser tão compacta. Quando as quatro pontes de dissulfeto que estabilizam a estrutura de uma ribonuclease são reduzidas em uma solução de uréia, a cadeia polipeptídica assume uma conformação espiralada randômica e perde toda a sua atividade enzimática. No momento em que se retira a uréia, o agente redutor e em que as pontes de dissulfeto restabelecem, mais de 90% da atividade enzimática volta a ocorrer e as propriedades da molécula retornam àquelas do estado original (LEHNINGER *et al* 1995).

Na estrutura terciária, a proteína está enrolada de uma maneira complexa e irregular, formando um prisma compacto, triangular e às vezes achatado. Nesta conformação os grupos heme e quase todos os resíduos de aminoácidos polares estão na superfície enquanto que quase todos os resíduos de aminoácidos não polares estão orientados para o interior da molécula. Conseqüentemente, os resíduos hidrofílicos estão expostos ao solvente, água, enquanto os resíduos hidrofóbicos são removidos da água o quanto possível. Um número grande de diferentes ligações está envolvido na estabilização desta conformação terciária. Estas incluem ligações eletrostáticas, pontes de hidrogênio, pontes hidrofóbicas, pontes dipolares e pontes de dissulfeto (LEWIN 2001).

Muitas enzimas são compostas de uma cadeia polipeptídica simples que é o caso de enzimas como a ribonuclease, lisosima, tripsina, pepsina e algumas alfa amilases. Existe também um grande número de enzimas que são compostas por mais

de uma cadeia peptídica. Um exemplo deste caso é a enzima lactato-desidrogenase é composta por quatro cadeias polipeptídicas. A repetição das cadeias polipeptídicas na construção de uma macromolécula de proteína caracteriza a estruturação quaternária que esta pode assumir (DIXON & WEBB 1979).

Em relação ao RNA que possui atividade catalítica da mesma forma que uma enzima convencional (proteica), o termo apregoado para tal é ribozima. No entanto, quando se refere a uma atividade catalítica do RNA, sabe-se que algumas dessas reações são direcionadas contra substratos separados enquanto outras intramoleculares, dessa forma, limitando a ação catalítica a um único ciclo. Por exemplo, pequenos RNAs da classe virusóide têm a capacidade de executar um reação de autoclivagem. Embora esta reação seja intramolecular, a molécula pode ser dividida em uma parte “enzimática” e uma parte de “substrato”. Ademais, a modificação por engenharia genética de seqüências relacionadas pode criar “enzimas” que atuam sobre “substratos” independentes (LEWIN 2001).

Com relação aos íntrons do grupo I e do grupo II, estes possuem em comum o fato de que o próprio RNA é capaz de realizar a reação de *splicing in vitro*, sem necessitar das atividades enzimáticas supridas por proteínas; no entanto as proteínas são quase que necessárias *in vivo*, para o estabelecimento das estruturas secundárias adequadas. Estes possuem a capacidade de auto-remover-se de um pré-mRNA que os contém. A modificação por engenharia genética de íntrons do grupo I gera moléculas de RNA que possuem várias outras atividades catalíticas relacionadas à atividade original. A atividade catalítica de um íntron do grupo I é conferida pela capacidade que o mesmo tem de gerar estruturas secundária e terciária específicas, criando sítios ativos equivalentes aos de uma enzima convencional.

4. NOMENCLATURA E CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS

A nomenclatura das enzimas tem sido utilizada de várias maneiras. A mais utilizada é feita pela adição do sufixo *-ase* ao nome do substrato (chamada de Nome Recomendado), ou seja, a molécula na qual a enzima exerce sua ação catalítica. Neste

caso, a enzima *urease* catalisa a hidrólise da uréia em amônia e CO₂, a *arginase* catalisa a hidrólise da arginina em ornitina e uréia, e a *fosfatase* catalisa a hidrólise de ésteres de fosfato.

Entretanto, esta nomenclatura simples não tem se mostrado prática uma vez que muitas enzimas recebem denominações que, do ponto de vista químico, são muito pouco informativas. Por esta razão, e também devido à descoberta de novas enzimas, foi proposta uma classificação sistemática recomendada por uma comissão internacional de especialistas no estudo de tais macromoléculas.

O novo sistema de classificação divide as enzimas em seis classes principais, nas quais estão incluídas subclasses de acordo com o tipo de reação catalisada (LEHNINGER *et al* 1995). De acordo com esta sistemática, cada enzima é designada por um Nome Recomendado, usualmente pequena e apropriada para o uso diário, um Nome Sistemático, o qual identifica a reação catalisada, e um Número de Classificação, o qual é usado quando uma identificação precisa é necessária. Como exemplo do novo sistema de classificação, considere a reação abaixo catalisada por uma enzima:



O Nome Recomendado para esta enzima, que é o normalmente usado, é *creatininaquinase* e o Nome Sistemático, baseado na reação catalisada, é *ATP:creatina fosfotransferase*. Seu número de classificação é *EC 2.7.3.2*, onde *EC* representa Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology - IUBMB, o primeiro dígito, 2, a Classe (*transferase*), o segundo dígito, 7, a Subclasse (*fosfotransferase*), o terceiro dígito, 3, a Sub-subclasse em que a *fosfotransferase* apresenta um grupo nitrogenado comoceptor, e o quarto dígito, 2, designa uma creatina quinase. A tabela 1 relaciona os códigos utilizados para a aplicação do número de identificação das enzimas (MATHEWS & Van HOLDE 1995).

Tabela 1 - Classificação das Enzimas Segundo a Comissão de Enzimas

-
1. Oxido-redutases (reações de oxidação-redução ou transferência de elétrons – Desidrogenases e Oxidases)
 - 1.1.atuando em CH-OH
 - 1.2.atuando em C=O
 - 1.3.atuando em C=O-
 - 1.4.atuando em CH-NH₂
 - 1.5.atuando em CH-NH-
 - 1.6.atuando em NADH, NADPH
 2. Transferases (transferem grupos funcionais como amina, fosfato, acil, carboxil – Quinases e Transaminases)
 - 2.1.grupos com um carbono
 - 2.2.grupos aldeído ou cetona
 - 2.3.grupos acil
 - 2.4.grupos glicosil
 - 2.5.grupos fosfatos
 - 2.6.grupos contendo enxôfre
 - 3.Hidrolases (reações de hidrólise de ligação covalente - Peptidases)
 - 3.1.ésteres
 - 3.2.ligações glicosídicas
 - 3.3.ligações peptídicas
 - 3.4.outras ligações C-N
 - 3.5.anidridos ácidos
 - 4.Liases (catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico – Dehidratases e Descarboxilases)
 - 4.1. =C=C=
 - 4.2. =C=O
 - 4.3. =C=N-
 - 5.Isomerases (reações de interconversão entre isômeros óticos ou geométricos – Epimerases)
 - 5.1.racemases
 - 6.Ligases (catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas pré-existentes, sempre às custas de energia - Sintetases)
 - 6.1. C-O
 - 6.2. C-S
 - 6.3. C-N

5. CINÉTICA DA CATÁLISE ENZIMÁTICA

A cinética enzimática é a parte da Enzimologia que estuda a velocidade das reações enzimáticas bem como os fatores que a influenciam. Os princípios gerais da cinética das reações químicas aplicam-se às reações catalisadas enzimaticamente, embora estas também mostrem um padrão distinto que não é usualmente encontrado nas reações não enzimáticas: saturação com o substrato.

Todas as enzimas apresentam o efeito da saturação variando, porém, consideravelmente no que diz respeito à concentração requerida para produzi-lo. Esse efeito de saturação levou alguns pesquisadores a estabelecerem a hipótese de que enzima e substrato reagem reversivelmente para formar um complexo, passo essencial na catálise de uma reação (DIXON & WEBB 1979).

Em 1913 a teoria da ação e cinética enzimática foi desenvolvida por dois cientistas chamados L. Michaelis e M. L. Menten, na qual uma reação enzimática pode ser expressa pela seguinte equação, considerando-se apenas um substrato:



As moléculas do substrato passam por uma série de formas geométrica e eletricamente alteradas antes de formarem produtos da reação, e a energia livre destes intermediários, especialmente aquelas que se encontram em estados de transição mais instáveis, são os mais determinantes da taxa de reação.

As enzimas têm uma afinidade muito maior por estes estados de transição com o substrato do que por formas mais estáveis. Como esta interação diminui a energia destes estados de transição críticos, as enzimas podem acelerar uma determinada reação (LEHNINGER *et al* 1995)

A partir do modelo de reação proposto por estes pesquisadores, desenvolveu-se uma equação que nos permite demonstrar como a velocidade de uma reação varia em função da concentração do substrato, a qual está a seguir descrita:

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

Esta equação relaciona a velocidade (V_0), a velocidade máxima ($V_{\max}$) e a concentração inicial de substrato com a constante de Michaelis-Menten (K_m). O K_m de um substrato é a concentração do substrato na qual a velocidade inicial de reação equivale à metade da velocidade máxima (LEHNINGER *et al* 1995).

Para reações que envolvem um substrato é expressa em moles por litro e é independente da concentração da enzima. O quadro abaixo relaciona algumas enzimas e seus respectivos K_m (DIXON & WEBB 1979).

Pode-se observar na tabela 2, que os valores de K_m não são fixos e podem variar com a estrutura do substrato, com o pH e com a temperatura. Para enzimas que atuam em mais de um substrato, cada substrato tem um K_m característico.

Tabela 2 – Relação de enzimas e suas constantes de Michaelis-Menten (K_m)

Enzima	Substrato	K_m (mM)
Catalase	H_2O_2	25
Hoxoquinase	Glicose	0,15
	Frutose	1,5
Quimiotripsina	N-benzotirosinamida	2,5
	N-formiltirosinamida	12,0
	N-acetiltirosianamida	32
	Gliciltirosinamida	122
Anidrase carbônica	HCO_3^-	9,0
Glutamato desidrogenase	Glutamato	0,12
	α -cetoglutarato	2,0
	NH_4^+	57
	NAD_{ox}	0,025
	NAD_{red}	0,018
Aspartato aminotransferase	Aspartato	0,9
	α -cetoglutarato	0,1
	Oxalacetato	0,04
	Glutamato	4,0

A constante de Michaelis-Menten de uma enzima é, portanto, uma característica muito importante e fundamental, não apenas matematicamente na determinação da velocidade da reação catalisada como também na afinidade pelo substrato e na purificação das enzimas nos tecidos (DIXON & WEBB 1979)

6. MECANISMO DA AÇÃO ENZIMÁTICA

O princípio de catalisador é diminuir a energia de ativação. A enzima se liga a uma molécula de substrato em uma região específica denominada sítio de ligação. Esta região é um encaixe que apresenta um lado envolvido por cadeias de aminoácidos que ajudam a ligar o substrato, e o outro lado desta cadeia age na catálise (LEHNINGER *et al* 1995).

Em 1894 Emil Fischer propôs o modelo chave – fechadura para explicar a ação enzimática. A enzima se encaixa com o substrato específico no sítio ativo, como uma chave e fechadura. Tanto a enzima quanto o substrato sofrem distorções conformacionais para o encaixe. A enzima não aceita simplesmente o substrato, o substrato é distorcido para conformação exata do estado de transição, denominado encaixe por indução, proposto por Koshland (1958).

A enzima também encontra o lado específico da cadeia posicionando no lugar exato da ligação no processo catalítico, muitas vezes o lado da cadeia pode ser básico ou ácido promovendo a adição ou remoção de prótons (WHITAKER 1972). Em outras circunstâncias a enzima se agrupa a um íon metálico na posição correta para a ocorrência da catálise. Ao completar a reação catalítica a enzima libera o produto e retorna a forma original. O processo ocorre em duas etapas:



* complexo enzima-substrato

Muitos tipos de moléculas inibem as enzimas e podem agir de várias formas. A principal distinção é entre inibição reversível e inibição irreversível. A forma que envolve ligações não-covalentes é reversível, através da remoção do inibidor. Em alguns casos as ligações não-covalentes podem ser irreversíveis sob diferentes

condições fisiológicas. Já a inibição irreversível, a ligação molecular é covalente. São geralmente encontrados em reações que apresentam toxinas específicas.

Uma molécula apresenta estrutura semelhante ao substrato da enzima que se liga para realizar a catálise, ela poderá aceitar esta molécula no seu local de ligação, mas não pode levar ao processo catalítico, pois ocupa o sítio ativo do substrato correto (LEHNINGER *et al* 1995). Nesse caso, inibição reversível competitiva, o inibidor compete pelo mesmo local do substrato. O efeito da reação modifica o K_m , mas não altera a velocidade.

No caso de um inibidor reversível não competitivo uma molécula ou íon pode se ligar em um segundo local na superfície enzimática (não no sítio ativo). Isto pode distorcer a enzima tornando o processo catalítico ineficiente. O inibidor não competitivo pode ser uma molécula que não se assemelha com o substrato, mas apresenta uma grande afinidade com a enzima. É o mecanismo inverso do inibidor competitivo, porque inibe a ligação do complexo ES e não da enzima livre (WHITAKER 1972). O efeito da reação modifica a velocidade e o K_m permanece constante.

Já na inibição irreversível, algumas substâncias se ligam covalentemente às enzimas deixando-as inativas. Na maioria dos casos a substância reage com o grupo funcional no sítio ativo bloqueando o local do substrato, deixando a enzima cataliticamente inativa. Inibidores irreversíveis podem ser extremamente seletivos pois são semelhantes ao substrato. São muito utilizados como resíduos, os quais apresentam grupos de átomos que se configuram semelhantemente ao estado de transição que se ligam ao substrato (RAO *et al* 1998).

Em relação aos cofatores pode-se dizer que para alguns tipos de processos biológicos, apenas a cadeia protéica não é suficiente, por isso a proteína requer esse tipo de molécula, cofator, a qual pode ser uma pequena molécula orgânica denominada coenzima ou um íon metálico (RAWN 1989).

Os cofatores são geralmente estáveis em temperatura alta. A catálise ativa enzima-cofator é denominada holoenzima, quando o cofator é removido, se mantém a proteína, a qual é catabolicamente inativa e é denominada apoenzima.

Outro caso é o da coenzima, que é a molécula orgânica que se liga às enzimas para ativar uma reação e cada tipo apresenta uma função química particular, algumas são agentes oxi-redutoras, outras transferidoras etc.

Para exemplificar, consideramos a coenzima dinucleotídeo nicotinamida de adenina (NAD^+). Esta molécula contém duas partes principais: a porção difostato adenosina, ligando uma ribose a uma nicotinamida. A outra porção é a parte final da molécula do NAD^+ onde o anel de nicotinamida será imediatamente reduzido e ainda servirá como agente oxidante. Uma reação típica que o NAD^+ participa é na conversão do álcool em aldeídos e cetonas, o qual age como agente oxidante (DIXON & WEBB 1979).

Algumas vezes é difícil distinguir uma verdadeira coenzima de um segundo substrato. Durante uma catálise, uma coenzima tem a capacidade de através de oxirreduções, ser reutilizada por outra enzima, voltando novamente a ciclo metabólico (LEHNINGER *et al* 1995). Por exemplo, o NAD^+ após a oxidação do substrato, passa a NADH , ativa a reação, deixa a enzima e novamente será oxidada por um sistema de aceptor de elétrons, voltando a ser NAD^+ e assim podendo se ligar a outra enzima. Já um segundo substrato nunca deixa a enzima, ele é reduzido e oxidado no ciclo metabólico.

Muitas coenzimas são fortemente relacionadas com vitaminas. As vitaminas são moléculas orgânicas essenciais para o processo biológico em organismos superiores e não podem ser sintetizados por eles mesmos. Portanto estas coenzimas são essenciais aos processos metabólicos vitais dos organismos superiores (RAWN 1989).

Outra estrutura que apresenta a mesma função de coenzima, são as metaloenzimas. São enzimas que têm íons metálicos ligados covalentemente nas cadeias de aminoácidos ou em grupos protéicos como o grupo heme. Os metais que se ligam às enzimas agem como metais catalíticos em reações hidrolíticas e outros com agentes redutores.

7. TÉCNICAS EMPREGADAS NO ESTUDO DAS ENZIMAS

7.1. ANÁLISE DE VELOCIDADE DE REAÇÃO CATALÍTICA

Existem duas formas essenciais para o estudo da cinética de uma enzima. Inicialmente devem ser feitas medições, sob condições na qual mantenha o estado de equilíbrio, depois observar a aplicabilidade da equação de Michaelis-Menten e determinar a velocidade de reação pela concentração do substrato e da enzima (RAWN 1989).

7.2. ANÁLISE DO EQUILÍBRIO DE REAÇÃO

O equilíbrio de uma reação enzimática é estabelecido em segundos ou poucos minutos. Vejamos algumas técnicas de avaliação:

7.3. ESPECTROFOTOMETRIA

É um método simples e apurado. É medido pela absorção de luz na região espectral do substrato ou produto formado na reação.

7.4. FLUORESCÊNCIA

É similar a metodologia de espectrofotometria. O substrato ou o produto deve emitir fluorescência neste espectro. A técnica é vantajosa por ser altamente sensível devendo a solução a ser empregada estar extremamente diluída.

7.5. TITULAÇÃO AUTOMÁTICA

É utilizada quando a reação produz ou consome ácido ou base. Titula-se na solução o ácido ou base para que o pH continue constante. A quantidade de ácido ou base consumido é o valor da reação catalítica enzimática.

7.6. ANÁLISE RADIOATIVA

É avaliado quando o substrato é marcado com isótopo radioativo, o qual será perdido ou transferido durante a reação a ser estudada. É um método extremamente sensível para análise cinética enzimática (RAO *et al* 1998).

8. ANÁLISES DE REAÇÕES COM ALTA VELOCIDADE

8.1 "STOPPED FLOW"

A enzima e o substrato são inicialmente separados em seringas, que rapidamente libera seu conteúdo até uma câmara misturadora e em seguida passa para a seringa que pára a reação. Neste instante um detector mede a absorbância de luz ou fluorimetria.

8.2. "TEMPERATURE JUMP"

O processo ocorre quando a mistura de reação, que está em equilíbrio numa Temperatura 1, passa rapidamente para uma temperatura 2 . O ponto de equilíbrio mudará e a reação deve ocorrer para que a reação alcance um novo equilíbrio. A mudança rápida de temperatura é obtida por uma explosão de corrente elétrica nos

eletrodos imergidos na mistura de reação. O tempo de relaxamento entre a mudança de temperatura é medido por absorbância ou fluorescência (WHITAKER 1972).

9. ANÁLISE QUANTITATIVA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para obtenção de uma análise quantitativa é necessário saber:

- ✓ Toda estequiometria de uma reação catalítica;
- ✓ Se a enzima requer adição de cofatores como um íon ou coenzima;
- ✓ A dependência da enzima sob a concentração do cofator ou substrato;
- ✓ O pH ótimo;
- ✓ A temperatura pela qual a enzima está estável e apresenta alta atividade;
- ✓ O procedimento para determinação do aparecimento e desaparecimento do substrato de um produto de reação;
- ✓ A análise quantitativa é confirmada quando o substrato ou o produto é colorido ou absorvido em luz ultravioleta. O valor de aparecimento ou desaparecimento do produto ou substrato absorvido por luz pode ser analisado pelo espectrofotômetro;
- ✓ Além do produto ou substrato pode - se analisar o intermediário (aquele que serve como ponte para o desencadeamento de outra reação).

10. PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

As enzimas são encontradas na natureza em misturas complexas, geralmente as células apresentam centenas ou mais diferentes enzimas, para um estudo aprofundado deve-se purificar a enzima a ser estudada (ALVAREZ-SANCHEZ 2000).

Em alguns casos é possível através da aplicação de métodos específicos utilizar enzimas nos estado impuro, mas na maioria dos casos, a presença de outras enzimas interfere nos substratos desviando as reações específicas.

10.1. MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO

- ✓ Teste – primeiramente faz-se uma análise quantitativa da atividade da enzima a ser estudada. A enzima deve ser isolada utilizando - se o teste de atividade em diferentes frações, sendo mais importante que a exatidão do método.
- ✓ Procedimento Geral – definição da unidade enzimática, concentração e atividade específica.
- ✓ Origem enzimática – determinação do local (tecido) de maior quantidade, geralmente a rápida centrifugação adquire enzimas mitocondrial.
- ✓ Extração – é necessário ter a enzima em solução e, portanto, a ruptura de membranas. Deve -se utilizar um tampão, pois ao romper o tecido pode ocorrer liberação de substâncias ácidas que degradam a enzima. Os métodos utilizados são o mecânico com partículas de areia, nitrogênio líquido, "shaker" em alta velocidade, ondas de ultrassom e solventes como acetona.

10.2. UNIDADE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

É definida pela quantidade que causa transformação de 1 μ mol (micromole) de substrato por minuto a 25°C sob condições ótimas. A atividade específica é o número de unidade de enzimas por miligrama de proteína, mede a pureza da enzima.

A atividade molar ou molecular ou número de "turnover", é o número de moléculas do substrato transformado por uma única molécula de enzima ou único sítio de ligação em um minuto, quando a enzima está no valor de limite. A atividade molar pode ser calculada pela velocidade máxima.

A nova unidade internacional da atividade enzimática determinada pela "Comissão da Enzima" é o "katal", o qual é definido como a transformação do substrato em 1 mol por segundo (LEHNINGER *et al* 1995).

10.3. MÉTODOS DE FRACIONAMENTO

O extrato de enzimas apresenta inúmeras substâncias com diferentes pesos moleculares e de acordo com seu interesse de estudo utilizam-se diferentes métodos:

- ✓ Precipitação por diferença de pH;
- ✓ Desnaturação por aquecimento;
- ✓ Precipitação com solventes orgânicos (etanol, acetona);
- ✓ Precipitação por sais (sulfato de amônia);
- ✓ Adsorção;
- ✓ Cromatografia - o mecanismo de separação depende da adsorção, troca iônica, afinidade específica para imobilizar ligantes específicos ou efeitos de peneiramento molecular;
- ✓ Eletroforese - a mobilidade das proteínas é causada por campo elétrico;
- ✓ Cristalização;
- ✓ Concentração – redução de volume através de evaporação do solvente ou congelamento.

11. DETERGENTES COMUNS (DETERGENTES IÔNICOS):

Detergentes são substâncias que têm a propriedade de tornar solúveis em água substâncias que não são solúveis ou têm baixa solubilidade. Eles agem basicamente sobre as gorduras, mas pouco agem sobre proteínas e polissacarídeos, que são componentes abundantes na matéria orgânica (ALVAREZ 1994).

Os detergentes comuns são conhecidos como detergentes iônicos. Eles possuem uma estrutura básica, composta por duas partes: uma que se liga às moléculas de água e outra que se liga às moléculas da substância a ser diluída, como a matéria orgânica, fazendo uma ponte entre as substâncias e as moléculas de água, permitindo que àqueles sejam dissolvidas. Estes são constituídos por íons, estruturas químicas responsáveis pela sua capacidade de solubilizar a matéria orgânica, sendo

assim chamados de detergentes iônicos ou sabões iônicos. Esse tipo de detergente é mais potente, pois possui muito mais íons livres, porém, por outro lado, acabam reagindo de forma inespecífica com outras substâncias, compostas por matéria orgânica ou não.

A ação dos detergentes iônicos sobre o instrumental é microscópica, mas com o uso rotineiro a após um breve período, aparecem os danos.

12. DETERGENTES ENZIMÁTICOS:

O princípio ativo inovador e mais importante dos detergentes enzimáticos, como o próprio nome diz, são as enzimas. Estas são substâncias bioquímicas que têm a propriedade de promover transformações específicas em outras substâncias bioquímicas, como as proteínas, gorduras e açúcares. O processo de digestão de alimentos que ocorre em nosso organismo, dá-se essencialmente à base de enzimas que decompõem as estruturas moleculares complexas em estruturas simples, podendo então ser dissolvidas e absorvidas pelas células dos intestinos (ALVAREZ 1994).

As enzimas, segundo a resolução normativa nº1/78 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), devem ser administradas como aditivos ou coadjuvantes nas formulações dos produtos de limpeza (Saneantes). Podem apenas ser utilizadas as enzimas amilolíticas, proteolíticas, lipolíticas e as celulasas. Em sujidades existentes em tecidos estas enzimas presentes nos detergentes possuem funções específicas.

As amilases trabalham removendo as manchas de amido que não aderem somente nas fibras de algodão e celulose, mas podem também se ligar à mancha. Em geral, tecidos contaminados com este filme “invisível” de amido, estão expostos à coloração de outras sujidades encontradas na lavagem, fazendo com que este filme se torne visível após a lavagem. Esta “mancha aderida” prova que amido e celulose são quimicamente similares: a forte afinidade entre estes dois componentes é bastante conhecida (NOVOZYMES 2003). Esta afinidade explica a formação de um filme de amido – muitas vezes presente deliberadamente na fabricação dos tecidos e

provenientes ambos do derramamento accidental de alimentos e até mesmo do tratamento com produtos que auxiliam na passagem da roupa. Para a degradação do filme de amido, somente as amilases reagem especificamente sobre esta “cola” que encontra-se aderida à mancha.

As proteases trabalham com manchas de proteína orgânica tais como grama, sangue e ovo e tendem a aderir fortemente nas fibras têxteis podendo revestir uma grande superfície de tecido. Além disso, assim como o amido, a proteína age como uma “cola”, aderindo e evitando que o sistema de detergente dissolvido remova completamente pigmentos e sujidades da superfície do tecido. As proteases irão degradar este filme e dessa forma liberar a mancha.

As lipases dissolvendo óleos e gorduras, quando não são completamente removidos pelo detergente, criam também um filme semelhante ao produzido pelas manchas de amido e proteína, o qual novamente induzirá a um aumento na superfície da mancha. Isto pode ser prevenido pelas lipases.

As celulasas ajudando as fibras a “liberar” a mancha. As fibras celulósicas tendem a atrair e aderir manchas. As celulasas são igualmente efetivas em liberar manchas aderidas às fibras de algodão tanto quanto reduzir a habilidade das fibras em se ligar a outras manchas após sua exposição.

Os detergentes enzimáticos fazem um processo semelhante ao da digestão e o fazem de forma rápida, pois possuem enzimas, que são mais eficientes sobre a matéria orgânica que os detergentes iônicos, pois agem de forma específica, não danificando os materiais constituintes dos equipamentos e instrumentos.

13. TIPOS DE ENZIMAS APLICADAS EM PRODUTOS DE LIMPEZA

Dentre as proteases, há quatro tipos diferentes sendo comercializados: a alcalase, a savinase, a everlase e a esperase. A alcalase é uma protease bacteriana, eficaz sob condições neutras e levemente alcalinas (pH 7-9,5). Esta é apropriada para preparações de molho, detergentes e líquidos para a lavagem de roupas delicadas com pH médio a baixo (ALVAREZ 1994) .

A savinase é uma protease bacteriana eficaz sob condições alcalinas (pH 9-10,5) e extremamente eficiente sob condições de temperaturas medianas de lavagem. A savinase é a protease preferida em muitos detergentes para a lavagem industrial de roupas.

A everlase é uma variante da savinase é proteicamente modificada para garantir uma excelente estabilidade no armazenamento de detergentes contendo lixívia. A everlase é amplamente usada tanto em detergentes para a lavagem industrial de roupas como em detergentes para lavar-louças (NOVOZYMES 2003)

A esperase é também de origem bacteriana e é eficaz sob condições fortemente alcalinas (até aproximadamente pH11,5) até mesmo a altas temperaturas. Esta é mais comumente usada em detergentes para a lavagem industrial de tecidos e lava-louças.

Quanto as amilases, existem dois tipos principais: a termamyl e a duramyl. A termamyl é de origem bacteriana sendo capaz de trabalhar sob valores de pH relativamente altos (alcalinos) e sob altas temperaturas (até 90°C). Esta enzima pode ser usada em detergentes para a lavagem de roupas e roupas.

A duramyl é uma amilase proteticamente modificada caracterizada por apresentar excelente estabilidade durante o armazenamento de detergentes contendo lixívia. A duramyl é amplamente usada em detergentes para a lavagem industrial de roupas e para a lavagem automática de louças.

Temos dois tipos entre as lipases: a lipolase e a lipolase ultra. A lipolase é de origem fúngica sendo eficaz sob condições alcalinas (até aproximadamente pH 11) e sob uma ampla faixa de temperaturas. A lipolase ultra é uma variante da lipolase, sendo, também, modificada proteicamente e diferindo pelo fato de ser superior enquanto esta trabalha em potências iônicas altas, baixas temperaturas e elevados valores de pH e sob diversas combinações destas condições.

Em relação as celulases, temos dois tipos de enzimas: a celluzyme e a carezyme. A celluzyme é de origem fúngica contendo um complexo celulásico ativo na faixa de pH neutro a moderadamente alcalino (7 - 9,5). Esta enzima possui três efeitos: rejuvenescimento da cor, amaciamento e remoção de partículas de sujeira. O

efeito global é que a cellulzyme preserva a aparência atrativa do tecido novo. A aparência gasta do tecido, que se tornou opaco devido a lavagens e ao uso freqüentes, será restaurada, voltando a dar ao tecido um aspecto quase novo. Esta enzima atua em roupas feitas de fibras celulósicas, como algodão e mescla de algodão.

A carezyme é um celulase monocomponente, que é ativa na faixa de pH neutro a alcalino (7 – 10,5), sendo que o seu principal benefício é melhorar o rejuvenescimento das cores comparada à cellulzyme, porém também amacia as roupas e remove partículas de sujeira. Como a cellulzyme, ela atua nas roupas feitas de fibras celulósicas, como algodão e mescla de algodão.

14. CONCLUSÃO

Com base nos dados oferecidos, é possível perceber que as enzimas são úteis tanto para o consumidor quanto para as indústrias de grande porte. A vantagem desta para o consumidor está no fato de que usando diferentes combinações enzimáticas, há a possibilidade de incorporar as enzimas através de um equipamento de dosagem única. Isto significa que, para o consumidor, torna-se mais fácil e eficiente, um único produto com várias funções.

Além das enzimas serem específicas, o que torna o processo de lavagem mais rápido, essas são de baixo custo, são biodegradáveis e não agredem os equipamentos utilizados nas lavagens sendo, assim, vantagem para as grandes indústrias da área têxtil e de detergentes.

As enzimas para detergentes oferecem soluções que são mais eficazes mesmo a baixas concentrações, e mais ambientalmente corretas se comparadas a maioria dos outros ingredientes usados em formulações de detergentes. Essas, conforme a especificidade e após terminarem sua função são facilmente degradadas em processos de tratamento de efluente industrial e reabsorvidas dentro do ciclo biológico.

Para detergentes usados em lavagem de tecidos, podemos até mesmo utilizar combinações com celulasas que proporcionam rejuvenescimento de cores, manutenção da brancura, amaciamento e remoção de partículas de sujeira, dessa forma, além de limpeza total temos também o cuidado com o tecido.

Esta tecnologia, ambientalmente segura, tem o potencial para substituir os produtos químicos tradicionais na área de limpeza, assim como, reduzir os níveis de poluição e o desperdício e por consequência, melhorar o nosso padrão de vida.

15. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, F.E.; *Detergentes Enzimáticos*. Porto Alegre, p-15. 1994
- ALVAREZ-SANCHEZ, M.E.A., AVILA-GONZALEZ, L., BECERRIL-GARCIA, C., FATTEL-FACENDA, L.F., ORTEGA -LOPES, J. & ARROYO, R. *A novel cysteine proteinase (CP65) of Trichomonas vaginalis involved in citotoxicity. Microbial pathogenesis* Boston, USA., p-193-202. 2000
- BEYNOM, R.J; BOND, J.S.; *Proteolytic enzymes: A practical approach.*, Academic press. Oxford, 1989.
- DIXON, M.; WEBB, E.C. *Enzymes*. New York: Academic Press, 1979. 1116 p.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 1995. 839p.
- LEWIN, B.; *Genes VII*. Artemed. São Paulo, SP. 2001
- MATHEWS, C.K.; Van HOLDE, K. E. *Biochemistry. The Benjamin Cummings Publications*. Co., Inc., CA- USA. 1995. 1159p.
- NOVOZYMES. *Enzymes*. Disponível em:
<<http://www.novozymes.com>> Acesso em: 13 de Agosto de 2003.
- RAO, M.B.; TANKSALE, A .P.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V.; *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, microbiology and molecular biology reviews*. Academic press. Nova Iorque, USA. p-597-635. 1998.
- RAWLING, N.D.; BARRET, A.; *Families of serine peptidases*. Meth. Enzymol. p-18-61. 1994
- RAWN, J. D. *Biochemistry*. USA, NC: Neil Patterson Publications., 1989. 1105p.
- TORTORA, G.J.; GRABOWSKI, S.R.; *Princípios de Anatomia e fisiologia*. Nona Edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ. 2000.
- WHITAKER, J. R. *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. New York: Marcel Dekker Inc., 1972. 636p.