

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

**CAIO WOJSLAW GIRELLI**

**Formulação de detergentes enzimáticos utilizando o Planejamento  
de Experimentos**

**Lorena  
2013**

CAIO WOJSLAW GIRELLI

Formulação de detergentes enzimáticos utilizando o Planejamento de Experimentos

Monografia apresentada à Escola de Engenharia de Lorena como exigência para obtenção do certificado de Graduação em Engenharia Bioquímica pela Universidade de São Paulo.

Orientador: Dr. Júlio César dos Santos

**Lorena**  
**Novembro, 2013**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por esta e todas as demais conquistas alcançadas ao longo de toda a minha vida.

Aos meus eternos professores, meus pais Andeson Girelli (*in memoriam*) e Elizabeth Wojslaw, meus avós, tios e todos os familiares que contribuíram direta ou indiretamente com os seus valores éticos, morais e intelectuais.

Ao Prof. Dr. Júlio César dos Santos, que muito me ensinou e orientou durante todo o período de elaboração deste trabalho, contribuindo para meu desenvolvimento científico.

## RESUMO

GIRELLI, C. W. **Formulação de detergentes enzimáticos utilizando o Planejamento de Experimentos**. 2013. 72 f. Monografia (Graduação) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

Os detergentes são produtos que possuem a propriedade de diminuir a tensão superficial da água, facilitando as operações de limpeza. A eficácia dos detergentes modernos, no entanto, é bastante dependente de sua formulação, a qual deve incluir componentes que aumentam a eficiência da limpeza, considerando também os aspectos ligados à proteção ao meio ambiente. Neste sentido, o uso de enzimas na formulação de detergentes é fundamental e tem se tornado cada vez mais difundido. Desta forma, as indústrias de detergentes têm dedicado esforços na busca da melhor formulação para os produtos oferecidos ao consumidor. Baseados neste contexto, no presente trabalho serão apresentados os principais componentes de um detergente enzimático, incluindo novas tecnologias, e sua metodologia de formulação através de uma ferramenta estatística até então pouco empregado nesta área, denominada planejamento de experimentos. Ao final da revisão da literatura, fez-se uma discussão sobre como seria uma metodologia de estudos para a formulação de um detergente enzimático empregando planejamento de experimentos. Observou-se uma série de novos avanços na área, incluindo a importância do uso de enzimas, além da própria ferramenta de planejamento estatístico de experimentos que possibilita o desenvolvimento de novas formulações de forma mais rápida e econômica, resultando em benefícios importantes para as empresas do setor.

Palavras-chave: Detergentes. Aplicações de enzimas. Formulação de detergentes. Planejamento de experimentos.

## ABSTRACT

GIRELLI, C. W. **Formulation of a detergent containing enzymes using design of experiments methodology**. 2013. 72 f. Monografia (Graduação) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

Detergents are products which have the property of reducing the surface tension of the water and facilitate cleaning operations. The effectiveness of modern detergents, however, is very dependent on its formulation, which should include components that increase cleaning efficiency, but also considering the aspects of environmental protection. In this sense, the use of enzymes in detergent formulation is essential and it has become increasingly widespread. Thus, manufacturers of detergents have devoted efforts in finding the best formulation for products offered to consumers. Based on this framework, in this paper we present the main components of an enzymatic detergent, including new technologies, and its formulation methodology through a statistical tool hitherto little used in this area, called design of experiments. At the end of the literature review, has a discussion about how it would study a methodology for the formulation of an enzymatic detergent using design of experiments. It was observed a number of new advances in the area, including the importance of the use of enzymes, and the experimental planning tool that enables the development of new formulations fastest and most economical.

Keywords: Detergents. Enzymatic applications. Detergent formulation. Design of experiments.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 2.1</b> – Modelo conceitual básico para a elaboração de uma formulação de um detergente .....	14
<b>Figura 2.2</b> – Molécula que constitui um surfactante .....	15
<b>Figura 2.3</b> – Esquema da ação de um surfactante .....	16
<b>Figura 2.4</b> – Eficiência da lavagem em função da dureza da água .....	19
<b>Figura 2.5</b> – Representação de um zeólito sintético.....	20
<b>Figura 2.6</b> – Atuação do SRP.....	22
<b>Figura 2.7</b> – Estrutura genérica do terpolímero proveniente da reação entre PET e PEG .....	23
<b>Figura 2.8</b> – Representação do filme formado pelos grupos polietileno.....	23
<b>Figura 2.9</b> – Atuação da PVN durante a lavagem .....	24
<b>Figura 2.10</b> – Representação esquemática das reações da TAED (1) e NOBS (2) com o peróxido de hidrogênio .....	27
<b>Figura 2.11</b> – Fluxograma simplificado da produção de enzimas microbianas por fermentação submersa .....	31
<b>Figura 2.12</b> – Efeitos de limpeza das enzimas in situ.....	32
<b>Figura 2.13</b> – Representação da hidrólise de proteínas catalisada.....	34
<b>Figura 2.14</b> – Representação da molécula de celulase.....	37
<b>Figura 2.15</b> – Efeito da enzima após quatro ciclos de lavagem: espaços entre as fibras são abertos, o perfil dos fios está mais alinhado e as fibras do algodão tornam-se mais suaves .....	39
<b>Figura 2.16</b> – Microscopia eletrônica de transmissão dos cortes transversais ultrafinos das fibras de algodão de uma camisa utilizando tetróxido de ósmio para coloração .....	39
<b>Figura 2.17</b> – Microscopia eletrônica das seções longitudinais dos fios de um tecido de algodão lavados com detergente comum (esquerda) e com detergente contendo lipase (direita).....	41
<b>Figura 2.18</b> – Concentrações relativas de óleo residual de um tecido sujo com gordura lavado com e sem lipase .....	41
<b>Figura 2.19</b> – Representação de um sistema ligando as variáveis de entrada às variáveis de saída .....	45

<b>Figura 2.20</b> – Superfícies de resposta de um exercício proposto por Bruns, Scarminio e Neto (2010) (Tabela 2.9). Rendimento em função da temperatura e concentração, fixando-se o catalisador A (esquerda) e B (direita).....	53
<b>Figura 3.1</b> – Representação dos eixos do sistema tridimensional policromático..	56
<b>Figura 3.2</b> – Planejamento fatorial $2_{IV}^{14-9}$ para a etapa de <i>screening</i> de uma formulação completa de detergente.....	64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1</b> – Principais componentes de um detergente sintético.....	14
<b>Tabela 2.2</b> – Surfactantes utilizados comercialmente.....	17
<b>Tabela 2.3</b> – Principais polímeros e sua atuação nos detergentes.....	21
<b>Tabela 2.4</b> – Alvejantes utilizados na formulação de um detergente.....	25
<b>Tabela 2.5</b> – Consumos durante a lavagem de roupas ao longo das décadas ....	29
<b>Tabela 2.6</b> – Algumas das enzimas proteolíticas comerciais .....	33
<b>Tabela 2.7</b> – Algumas amilases comerciais e suas características .....	35
<b>Tabela 2.8</b> – Algumas amilases comerciais e suas características .....	37
<b>Tabela 2.9</b> – Exemplo de uma matriz de planejamento fatorial $2^3$ .....	46
<b>Tabela 2.10</b> – Resultados de uma matriz de planejamento fatorial $2^3$ .....	47
<b>Tabela 3.1</b> – Formulação de um detergente.....	61
<b>Tabela 3.2</b> – Sugestão de um planejamento $2^4$ completo para a formulação enzimática em um detergente comum .....	62
<b>Tabela 3.3</b> – Níveis selecionados para cada componente com base na composição da Tabela 3.1 .....	65

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
<b>2.1</b>	<b>A indústria dos detergentes sintéticos</b> .....	12
<b>2.2</b>	<b>O detergente e seus componentes</b> .....	14
2.2.1.	Surfactantes .....	15
2.2.2	Sequestrantes de dureza ( <i>builders</i> ) .....	18
2.2.3	Polímeros .....	20
2.2.4	Alvejantes.....	24
2.2.5	Enzimas .....	28
2.2.5.1	<i>Proteases</i> .....	32
2.2.5.2	<i>Amilases</i> .....	34
2.2.5.3	<i>Celulases</i> .....	36
2.2.5.4	<i>Lipases</i> .....	40
<b>2.3</b>	<b>O Planejamento de Experimentos</b> .....	42
2.3.1	Como variar tudo ao mesmo tempo .....	44
2.3.2	Quando as variáveis são muitas .....	54
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA PROPOSTA</b> .....	56
<b>3.1</b>	<b>Avaliação instrumental da eficiência de lavagem</b> .....	56
<b>3.2</b>	<b>Seleção e preparação das amostras de tecidos</b> .....	57
<b>3.3</b>	<b>Seleção dos agentes de sujeira e sua aplicação nas amostras</b> .....	58
<b>3.4</b>	<b>Procedimento padrão</b> .....	59
<b>3.5</b>	<b>O Planejamento</b> .....	60
3.5.1	Formulação enzimática a partir de um detergente comum .....	61
3.5.2	Formulação de um detergente completo.....	63
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	67
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	68

## 1 INTRODUÇÃO

Detergente ou surfactante, por definição, é todo produto cuja finalidade seja de remover sujeira com eficiência. O sabão foi o primeiro detergente inventado pela humanidade. Há registros históricos de seu uso na Mesopotâmia, há mais de 2000 a.C. (Universidade Federal de Santa Catarina, 2010). Todo sabão é geralmente produzido pelo aquecimento de óleos vegetais e animais, misturados com um álcali (soda cáustica).

Já nos primeiros anos da era cristã, os gauleses ferviam sebo e cinzas para fabricar uma forma primitiva de sabão. Conhecido pelos romanos e fenícios e artigo de luxo na Idade Média, o sabão tornou-se produto de uso generalizado a partir do século XIX (MARTINS, 2009). Foi à partir da Segunda Guerra Mundial que a fabricação de sabão a partir de materiais naturais passou a diminuir em benefício dos detergentes sintéticos.

Os primeiros detergentes foram usados, principalmente, para a lavagem de louça à mão e roupas delicadas. Com a introdução em 1946 dos chamados “builders” (os mais comuns à base de fosfato), que diminuem a dureza da água e aumentam a eficácia dos surfactantes, foram desenvolvidos produtos para todo o tipo de roupa (MARTINS, 2009).

Os detergentes apresentam a propriedade de baixar a tensão superficial da água, facilitando-lhe a penetração nos tecidos e auxiliando a remover e manter em suspensão as sujeiras. Seus principais componentes são os tensoativos, constituídos de uma longa cadeia hidrocarbônica, que em média contém de 12 a 20 átomos de carbono, sendo, portanto hidrofóbica ou lipofílica (solúvel em óleos e gorduras), acompanhada de uma extremidade polar (hidrofílica) (Universidade Federal de Santa Catarina, 2010).

As principais características do uso de detergentes certamente são devidas aos tensoativos, os quais estão relacionados à formação de ambientes organizados, também conhecidos como micelas, que auxiliam na remoção da sujeira (Universidade Federal de Santa Catarina, 2010). Porém, a eficácia dos detergentes sintéticos atuais é função também de uma ampla gama de

componentes adicionados em sua formulação, os quais favorecem sua ação de limpeza.

Portanto, é de extrema necessidade que qualquer empresa fabricante de detergente, que queira se manter ativa neste mercado, esteja atenta ao conhecimento de seus componentes, novos substituintes desenvolvidos em pesquisas e, principalmente, a dosagem ideal entre eles que garanta a melhor qualidade do produto possível, conquistando o consumidor final.

Este trabalho apresentará a tecnologia e a finalidade envolvida em cada um de seus componentes, em particular as enzimas, discutindo-se e propondo-se uma metodologia para a otimização desta mistura tão complexa através do planejamento estatístico de experimentos, que garante a fórmula mais próxima da ideal utilizando uma menor quantidade de ensaios e, com isso, economizando recursos. Pretende-se que esta discussão possa servir de base à execução de experimentos em uma situação real, em ambiente industrial ou acadêmico.

Pode-se também ressaltar a baixa disponibilidade de informações completas a respeito dos componentes de detergentes sintéticos e da utilização do planejamento estatístico especificamente para otimização de sua composição, indicando a importância deste estudo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A indústria dos detergentes sintéticos

Em 1890, o químico alemão A. Kraft observou que pequenas cadeias de moléculas ligadas ao álcool funcionavam como sabão. Kraft produziu o primeiro detergente do mundo. Mas a novidade não passou na época de uma curiosidade química. Durante a Primeira Guerra Mundial, o bloqueio dos aliados cortou o suprimento de gorduras naturais, utilizadas para produzir lubrificantes. As gorduras de sabão foram substituídas e o produto tornou-se um artigo raro no país. Outros dois químicos alemães, H. Gunther e M. Hetzer retomaram as pesquisas de Kraft e lançaram em 1916 um detergente com fins comerciais, o Nekal, acreditando que seria usado apenas nos tempos de guerra (Universidade Federal de Uberlândia, 2013).

As vantagens do detergente sintético sobre o sabão foram logo aparecendo, pois originavam soluções de lavagens mais próximas da neutralidade por serem sais de ácidos fortes, ao contrário do sabão, oriundo de ácidos mais fracos, originando soluções levemente alcalinas (MORRISON e BOYD, 1996).

Ao longo das décadas, embora o sabão se tenha mantido popular no que se refere à higiene pessoal, a sua utilização na lavagem da roupa e da louça foi diminuindo. Em meados da Segunda Guerra Mundial, foi substituído por detergentes sintéticos devido ao baixo custo e elevada eficácia destes. O primeiro detergente para lavar roupa foi o Tide®, lançado nos Estados Unidos pela Procter & Gamble, em 1946 (Universidade Federal de Santa Catarina, 2010).

Durante o ano de 1955, o produto da marca Omo® foi lançado em Portugal, pela empresa Lever – nome adotado pela filial da Unilever no país até 1960. Sendo o primeiro detergente na Europa para roupas, adotou a difícil tarefa de tentar inverter a tendência de compra das tradicionais barras de sabão e levar as donas de casa a optar pelo detergente. Com a introdução das máquinas de lavar roupa em Portugal, as várias marcas de detergentes alastram-se a outros segmentos (UNILEVER, 2012).

O alquilbenzeno sulfonato de sódio, de origem petroquímica, era o principal surfactante utilizado na época. O alquilbenzeno inicialmente desenvolvido tinha cadeia lateral ramificada, o que dificultava sua degradação no meio ambiente e causava também a contaminação em águas de consumo humano. Além disso, este componente era extremamente espumante, gerando grandes “paredes” de espuma em rios, barragens e em estações de tratamento de águas (MARTINS, 2009).

Por volta dos anos 60, foi desenvolvido o alquilbenzeno linear sulfonato (LAS). Por ser igualmente sulfonado, apresentava as mesmas características de limpeza de seus antecessores, e sua cadeia linear agregava vantagens como maior biodegradabilidade e eficiência em águas duras (MORRISON e BOYD, 1996).

Com um arranque modesto, o uso de detergentes ligeiramente se popularizou. Desde então, a busca de métodos de lavagem rápida e eficaz, levou os fabricantes a investir na pesquisa e desenvolvimento de novos produtos que facilitassem as tarefas domésticas.

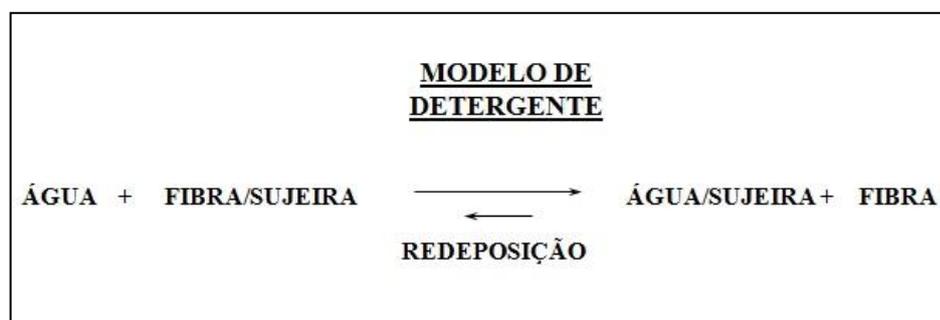
Logo depois, em 1963, nascia uma nova geração de detergentes em pó. Pela primeira vez, a protease comercializada pela Nordisk – divisão de enzimas, hoje Novozymes – foi introduzida em um detergente em pó (Universidade Federal de Santa Catarina, 2010).

De uma maneira crescente, o mercado para produtos de limpeza tem evoluído nas últimas décadas, registrando índices de crescimento constante, em resultado do desenvolvimento e lançamento de novos produtos. Embalagens atrativas e recicláveis, aberturas direcionadas, e principalmente fórmulas mais eficazes, são fatores de extrema importância no mercado de produtos de higiene doméstica.

Também as questões ecológicas têm desempenhado um papel cada vez mais importante na evolução do mercado dos detergentes. As recentes preocupações com meio ambiente impostas pelas legislações ambientais, levou à proliferação de produtos de limpeza doméstica baseados em ingredientes biodegradáveis e considerados menos nocivos para a natureza. Desta forma, tornam-se imperativos estudos visando-se ao desenvolvimento de formulações de detergentes que incluam componentes eficazes e ambientalmente amigáveis.

## 2.2 O detergente e seus componentes

O conceito básico para a elaboração de um detergente está especificado no simples conceito da Figura 2.1.



**Fig. 2.1.** Modelo conceitual básico para a elaboração de uma formulação de um detergente (informação pessoal<sup>1</sup>),

De acordo com um treinamento interno da Procter & Gamble, os componentes de um detergente podem ser classificados em dois grupos, dependendo do seu mecanismo de atuação, conforme mostra a Tabela 2.1.

**Tabela 2.1** - Principais componentes de um detergente sintético.

<b>Componentes</b>	<b>Atuação</b>
Surfactantes	
Controladores de pH	Ligação
<i>Builders</i>	Fibra-Sujeira
Polímeros	
Alvejantes	Moléculas da
Enzimas	Sujeira

<sup>1</sup> Procter & Gamble. Raw Material and Technology Training. Informação fornecida no treinamento interno para funcionários da empresa. 2013.

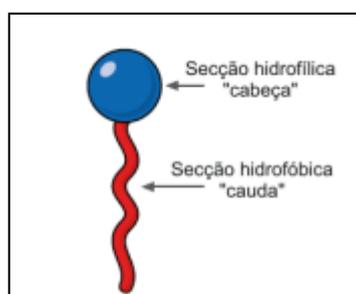
### 2.2.1. Surfactantes

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).

Em detergentes domésticos, o surfactante talvez seja o ingrediente mais importante, abrangendo entre 15% e 40% do total de uma formulação. De acordo com o grupo da cabeça polar, os surfactantes podem ser classificados como aniônicos, não-iônicos e catiônicos (YANGXIN, JIN e BAYLY, 2008).

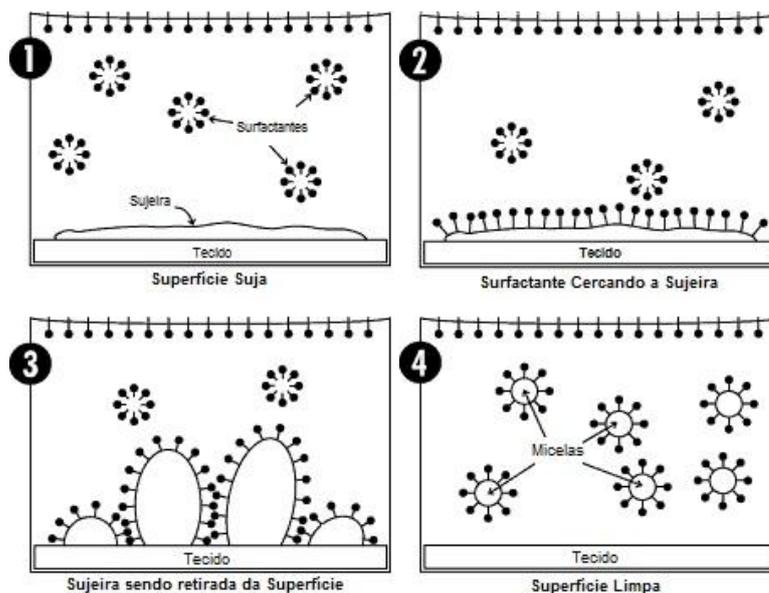
Porém, hoje em dia, a indústria não utiliza somente um tipo de surfactante específico, mas sim uma mistura das diferentes categorias para reforçar a sua capacidade de desempenho, melhores propriedades anti-redeposição, tolerância à dureza da água e para diminuir a agressividade à pele das mãos, quando lavadas manualmente (YANGXIN, JIN e BAYLY, 2008).

Independentemente de sua classificação, todos têm uma semelhança molecular comum. Uma das extremidades da molécula tem uma cadeia longa não polar que é atraída pelo óleo e sujidades (hidrofóbico), enquanto a outra extremidade é atraída pela água (hidrófilo), como mostrado na Figura 2.2.



**Figura 2.2** – Molécula que constitui um surfactante (MARTINS, 2009).

A Figura 2.3 esquematiza o seu meio de atuação. A parte hidrofóbica da molécula fica longe da água e a hidrofílica, próxima. Quando a sujeira ou gordura está presente (de natureza apolar), os surfactantes cercam-nas, ocasionando a formação das chamadas *micelas*, permitindo a dispersão das moléculas de sujeira na água, formando uma emulsão (Essential Industries, 2013).



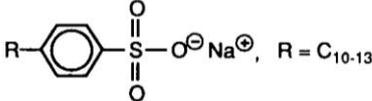
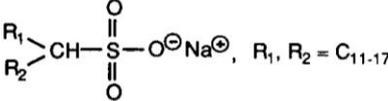
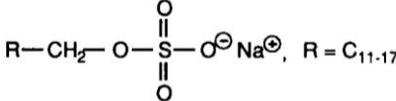
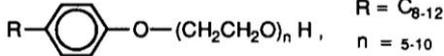
**Figura 2.3** – Esquema da ação de um surfactante (Essential Industries, 2013).

Deve-se notar que um agente tensoativo pode ser um sabão ou surfactante sintético. Os sabões são usados há séculos por serem feitos de materiais naturais, como gorduras animais e soda cáustica. Surfactantes sintéticos são os tensoativos de escolha para quase todos os agentes de limpeza (Essential Industries, 2013).

Desde o seu desenvolvimento nos anos 60, o alquilbenzeno linear sulfonado (*LAS*) tem sido um excelente surfactante aniônico obtido sinteticamente, além de barato e absolutamente fundamental para detergência. Porém é biodegradável somente em condições aeróbicas (Science in the Box, 2013).

Na Tabela 2.2 estão classificados os surfactantes mais utilizados comercialmente.

Tabela 2.2 – Surfactantes utilizados comercialmente.

Nome comum do surfactante Classe (Acrônimo)	Estrutura Geral
<i>Surfactantes Aniônicos</i>	
Sabões	$R-CH_2-COO^{\ominus}Na^{\oplus}$ , $R = C_{10-16}$
Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS)	 $R-C_6H_4-SO_3^{\ominus}Na^{\oplus}$ , $R = C_{10-13}$
Sulfonatos de Alcanos Secundários (SAS)	 $R_1-CH(R_2)-SO_3^{\ominus}Na^{\oplus}$ , $R_1, R_2 = C_{11-17}$
Álcool Graxo Sulfonado alquilsulfatos (FAS)	 $R-CH_2-O-SO_3^{\ominus}Na^{\oplus}$ , $R = C_{11-17}$
<i>Surfactantes Catiônicos</i>	
Quaternário de amônio (QAC)	$\left[ R_1-N^{\oplus}(R_2)(R_3)(R_4) \right] Cl^{\ominus}$ , $R_1 = R_2 = C_1$ $R_3 = R_4 = C_{16-18}$
<i>Surfactantes Não-iônicos</i>	
Alquilfenol Polietilenoglicol éters (APEO)	 $R-C_6H_4-O-(CH_2CH_2O)_n H$ , $R = C_{8-12}$ $n = 5-10$
Álcool Graxo Polietilenoglicol éters (AEO)	$R-CH_2-O-(CH_2CH_2O)_n H$ , $R = C_{7-17}$ $n = 3-15$

Fonte: BIERMANN, LANGE, *et al.* (1987)

*Alquilsulfatos* 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, LANGE, *et al.*, 1987).

*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 (Science in the Box, 2013).

Os trabalhos de Rocha (2009) mostram que os *AE* também podem ser produzidos por esterificação enzimática de ácidos graxos com alcoóis polihídricos, em meio orgânico e sob pressão reduzida, catalisada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada numa resina acrílica. São os chamados *biosurfactantes*.

Os biosurfactantes 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. Porém, a produção destes surfactantes não é ainda economicamente viável, quando comparada com seus equivalentes sintéticos (MERCADÉ e MANRESA, 1994).

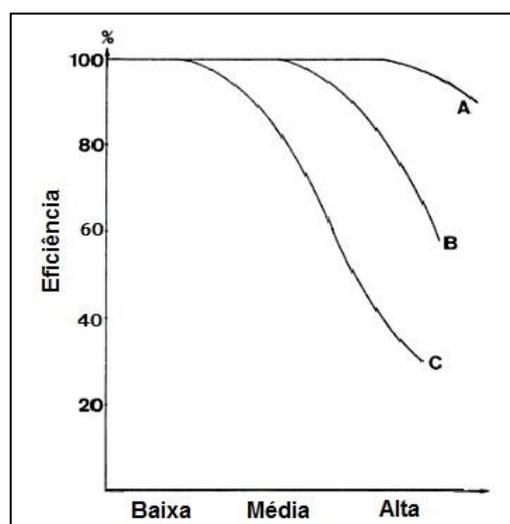
Apesar de o LAS ser fundamental para a detergência devido sua característica aniônica, em águas de lavagem com uma dureza elevada essa característica pode também ser prejudicial (Science in the Box, 2013).

Quanto maior a dureza da água, maior a concentração de metais como cálcio e magnésio. Esses metais dissolvidos em água na forma de cátions se combinam com os surfactantes aniônicos presentes na água de lavagem resultando na formação de um composto pouco solúvel, denominado espuma. A formação deste composto diminui a eficiência da lavagem, pois a espuma além de insolúvel, diminuindo a concentração de surfactantes livres na água, também se une às fibras dos tecidos tornando a roupa áspera (BRITO, 2012).

### 2.2.2 Sequestrantes de dureza (*builders*)

Os chamados *builders* são adicionados para proteger os surfactantes destes minerais encontrados na água garantindo a sua eficiência na lavagem (Figura 2.4), além de outras funções como regulagem do pH por tamponamento e emulsificação, impedindo a redeposição da sujeira. Entre os *builders* mais utilizados na indústria, encontramos carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), ácido cítrico

( $C_6H_8O_7$ ), agentes complexantes ou quelantes, como o EDTA, zeólitos sintéticos, como o AC-Base( $AlO_2$ )<sub>12</sub>( $Na_2O$ )<sub>6</sub>( $SiO_2$ )<sub>12</sub>. $yH_2O$ , e fosfatos, como o tripolifosfato de sódio ou TPF ( $Na_5P_3O_{10}$ ). Eles são divididos entre agentes precipitantes, sequestrantes e de troca de íons.



**Figura 2.4** – Eficiência da lavagem em função da dureza da água. A, 30% TPF; B, 20% TPF; C, 10% TPF (ZINI, 1987).

Plenamente difundido na indústria de detergentes com o nome de *barrilha*, o carbonato de sódio é um exemplo de agente precipitante. Ele reage com os cátions da água dura, gerando produtos insolúveis em água como o carbonato de cálcio ( $CaCO_3$ ) e carbonato de magnésio ( $MgCO_3$ ), e liberando  $Na^+$ , que não contribui para a dureza da água (CAHN, 1994).

Já agentes sequestrantes, como o TPF, o ácido cítrico e o EDTA, formam complexos solúveis com os componentes da água dura de forma rápida, sendo levados juntamente com a água de lavagem. No oeste da Europa e em outras regiões do mundo, o TPF tem sido substituído por zeólitos devido ao seu impacto ambiental, já que o excesso de fosfatos em rios e mananciais gera a eutrofização (CAHN, 1994).

O zeólito (Figura 2.5) é um representante da classe dos agentes de troca de íons. Eles funcionam como uma peneira, filtrando a água dura ao substituir os cátions  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ , pelo  $Na^+$  presente em sua molécula.

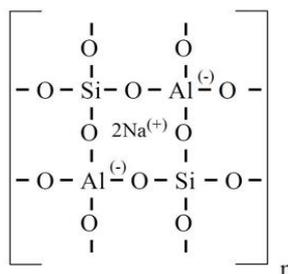


Figura 2.5 – Representação de um zeólito sintético.

É importante salientar que a quantidade de *builder* utilizada, bem como a escolha da molécula na formulação vai depender da característica de cada região. A água encontrada na América do Norte e Europa normalmente é muito mais dura que a água dos países latinos, por exemplo. Assim como a escolha de cada molécula não dependerá somente do seu custo-benefício, mas também da legislação ambiental do mercado em que se encontra, como a China que não permite a utilização de fosfatos em seus detergentes (informação pessoal<sup>2</sup>). No Brasil, estima-se que 79,4% dos poços possuem águas brandas (menos de 50 mg/L de CaCO<sub>3</sub>), 13,6% são pouco duras (50 a 100 mg/L), 5,5% são duras (100 a 200 mg/L) e 1,5% é muito dura (mais que 200 mg/L) (ZOBY e OLIVEIRA, 2005).

Além dos *builders*, existem muitos outros coadjuvantes utilizados para auxiliar os surfactantes na remoção da sujeira, como alvejantes e enzimas, que serão apresentados mais à frente e atuam diretamente nas moléculas das manchas, bem como os polímeros e suas diversas finalidades.

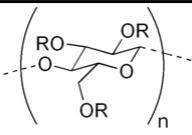
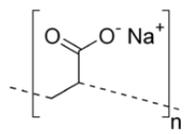
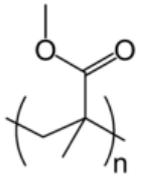
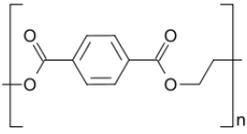
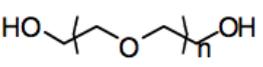
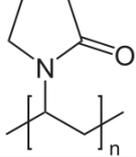
### 2.2.3 Polímeros

Existem vários tipos de polímeros utilizados em detergentes e produtos de limpeza. São peças essenciais para a fórmula do detergente e atuam em conjunto

<sup>2</sup> Id.Ibid.

com os ativos de limpeza, como surfactantes. Alguns ajudam na quebra da sujeira e a evitar a sua redeposição nos tecidos. Outros vão se ligar com os corantes que saem dos tecidos coloridos durante a lavagem e, assim, reduzir a transferência deles para roupas brancas em uma lavagem mista. Os polímeros mais comumente utilizados estão representados na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3** – Principais polímeros e sua atuação nos detergentes.

Polímero	Estrutura	Atuação
Carboximetilcelulose (CMC)		Evita redeposição de sujeira
Poliacrilato de sódio		
Polimetil-metacrilato (PMMA)		Ligação Fibras-Sujeira
Politereftalato de etileno (PET)		
Polietilenoglicol (PEG)		
Polivinilpirrolidona (PVP)		Corantes

A carboximetilcelulose (CMC) é comumente utilizada como agente contra a redeposição da sujeira depois que ela é removida, evitando assim o envelhecimento da roupa. Por ser uma molécula grande causa impedimento estérico contra a ligação fibra-sujeira. Este polímero pode atuar também como

*builder* durante a lavagem, e no aumento da viscosidade em detergentes líquidos (Science in the Box, 2013).

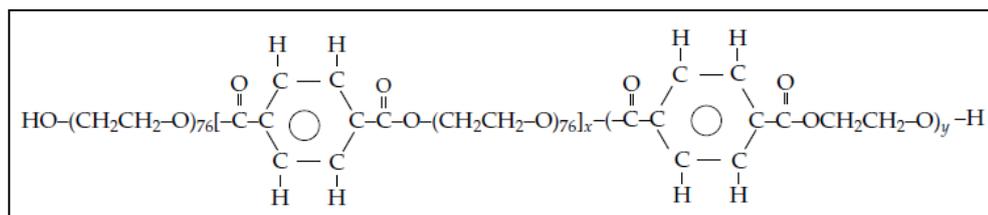
O aumento crescente do mercado de tecidos sintéticos tornou-se um desafio para os agentes de limpeza. Dentre as soluções desenvolvidas, podemos destacar os chamados *polímeros de liberação de sujeira* ou SRP (*soil release polymers*), cuja atuação está simplificada na Figura 2.6. Eles modificam a superfície de tecidos hidrofóbicos (como o poliéster), auxiliando na remoção das manchas de sujeira. Dentre os muitos polímeros que podem ser utilizados como auxiliares para atuar na ligação sujeira-fibra, os primeiros a serem utilizados foram os copolímeros de poliácridatos e acrílico (PMMA). Porém, como estes produtos sofrem um processo de cura no tecido que gera ligações cruzadas, tornando o polímero termorígido, a sua utilização é limitada a aplicações não domésticas (O'LENICK, 1999).



**Figura 2.6** – Atuação do SRP (Informação pessoal<sup>3</sup>).

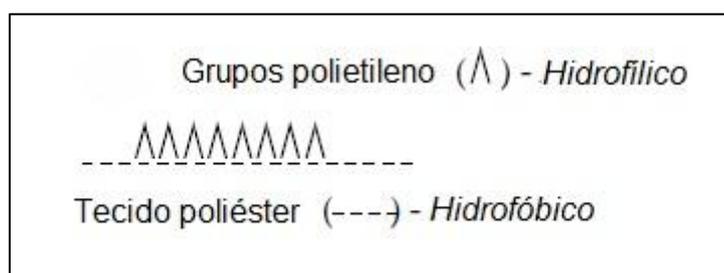
Por conta disso, novos polímeros como o PET e o PEG passaram a ser utilizados para esta finalidade. Reagindo PET a uma concentração de 15% com PEG a uma concentração de 85%, obtemos um terpolímero, ou seja, um polímero que contém o aromático tereftalato, o grupo de polioxietileno solúvel em água, e o grupo de etileno glicol, com um peso molecular de 23.000 a 25.000 g/mol, representado na Figura 2.7. Este peso molecular é bastante satisfatório para atuar em tecidos de poliéster ou blendas de poliéster/algodão (O'LENICK, 1999).

<sup>3</sup> Id. Ibid.



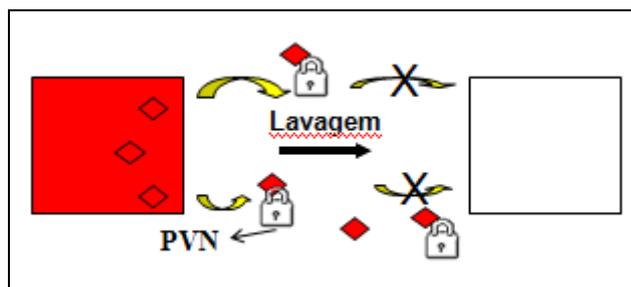
**Figura 2.7** – Estrutura genérica do terpolímero proveniente da reação entre PET e PEG (O'LENICK, 1999).

A atuação do SRP pode ser afetada pela presença de outros componentes do detergente, como surfactantes, *builders*, agentes anti-redeposição e outros materiais alcalinos. Seu mecanismo de atuação baseia-se primeiramente na adsorção do polímero na superfície dos tecidos submersos na solução de lavagem. O poliéster adsorvido forma então uma película hidrófila termoplástica, melhorando a absorção de água e as propriedades de liberação da sujeira, permanecendo no tecido seco após a lavagem, como mostrado na Figura 2.8. Lavagens subsequentes podem renovar este filme, adsorvendo novas camadas de polímeros a cada lavagem. Conseqüentemente, a eficiência na liberação da sujeira aumenta a cada ciclo de lavagem (O'LENICK, 1999).



**Figura 2.8** – Representação do filme formado pelos grupos polietileno (O'LENICK, 1999).

O terceiro tipo de polímero utilizado em detergentes sintéticos são os chamados *inibidores de transferência de corantes*. Um exemplo de polímero usado para esta finalidade é a polivinilpirrolidona (PVP), representado na Figura 2.9.



**Figura 2.9** – Atuação da PVN durante a lavagem (informação pessoal<sup>4</sup>).

O PVN age nos corantes derivados das roupas coloridas imersas na solução de lavagem, não permitindo a transferência deles para roupas brancas, reduzindo o envelhecimento dos tecidos brancos e mantendo as cores novas, vivas e mais resistentes aos ciclos de lavagem.

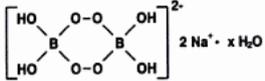
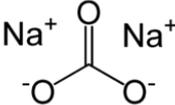
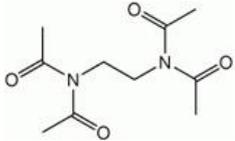
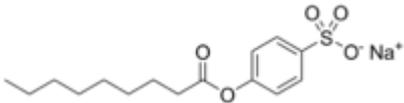
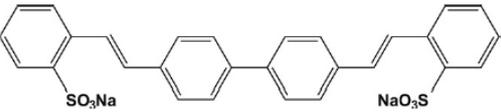
#### 2.2.4 Alvejantes

Os alvejantes descolorem o substrato por meio de ataque oxidante/redutor. Ele altera a capacidade de interação da mancha com a luz, podendo também quebrar ligações químicas para tornar a mancha mais solúvel, facilitando a lavagem e restaurando a cor branca. Por isso, alvejantes domésticos normalmente contêm agentes oxidantes como hipoclorito de sódio ( $\text{NaClO}$ ), perborato de sódio ( $\text{NaBO}_3$ ) mono (PBS-1) ou tetrahidratado (PBS-4), percarbonato de sódio ( $2\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o primeiro alvejante comercial, o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (MENDELSON, 2010).

Em detergentes normalmente são utilizados uma combinação de tecnologias alvejantes (Tabela 2.4). A maioria das formulações contém: I) uma fonte de peróxido de hidrogênio (perboratos ou percarbonatos); II) ativadores, tais como o tetraacetililenodiamina (TAED) ou o nonanoil-oxibenzeno-sulfonato de sódio (NOBS), propriedade da Procter & Gamble Co. e; III) branqueadores ópticos, tais como o Tinopal<sup>®</sup>, marca registrada da BASF S.A. (Informação pessoal<sup>1</sup>).

<sup>4</sup> Id.Ibid.

Tabela 2.4 - Alvejantes utilizados na formulação de um detergente.

Alvejante	Estrutura	Classe
Perborato de sódio (PBS-1/PBS-4)		Fonte de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
Percarbonato de sódio		
TAED		Ativadores
NOBS		
Tinopal® CBS-X		Branqueadores ópticos

A partir da estrutura química do perborato de sódio, podemos imediatamente deduzir que ele seja um portador de peróxido de hidrogênio, sendo dissociado em metaborato de sódio (NaBO<sub>2</sub>) e peróxido de hidrogênio ao entrar em contato com a solução aquosa. Esta propriedade dos perboratos torna possível a incorporação do peróxido de hidrogênio nos detergentes, sem grandes interações com outros componentes. Tanto o perborato tetrahidratado, quanto o monohidratado que é produzido através do aquecimento do tetrahidratado, satisfaz todos os requerimentos comerciais para alvejantes, tais como custo, manuseio seguro e preservação dos corantes das roupas, não danificando as fibras dos tecidos (CAHN, 1994).

O perborato monohidratado é mais vantajoso que o tetrahidratado com relação à facilidade de dissolução e por liberar a mesma quantidade de oxigênio ativo, possuindo menor densidade. Em contra partida, é mais sucessível a

absorção de umidade, necessitando maiores cuidados em sua armazenagem (CAHN, 1994).

O perborato de sódio começou a ser produzido em larga escala desde 1907, na Alemanha. Devido à escassez de matéria prima durante a Segunda Guerra Mundial, uma alternativa encontrada foi o percarbonato de sódio (CAHN, 1994). Apesar dos percarbonatos liberarem uma menor concentração de oxigênio ativo que o perboratos, 13% e 15% respectivamente (POLYORGANIC TECNOLOGIA LTDA, 2012), são considerados ecologicamente corretos por não liberar o metaborato de sódio ( $\text{NaBO}_2$ ), que em grandes quantidades podem ser prejudiciais para plantas e outras espécies (MAGELA, 2012).

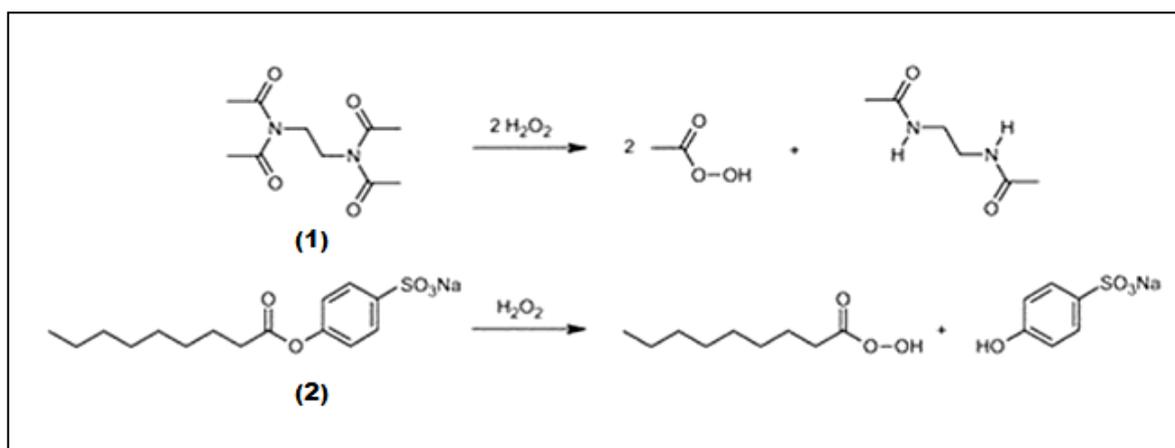
O percarbonato, também conhecido popularmente como “peróxido de hidrogênio sólido”, na verdade é um peridrato carbonato. Embora muito estável ao armazenamento, quando seco, o material sólido possui uma pequena pressão de vapor do peróxido de hidrogênio retido em sua forma cristalina, levando a uma troca com a umidade exterior e a reações violentas com substratos oxidáveis. Em contato com a água, a rede cristalina do percarbonato de sódio rapidamente se dissolve, liberando o peróxido de hidrogênio na solução aquosa (Organic Chemistry Portal, 2006).

O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) liberado se decompõe em água e oxigênio ativo ( $\text{O}^*$ ), que pode atuar no processo de lavagem por diversas formas, tais como: fracionar grandes moléculas ao romper ligações; oxidar pigmentos, destruindo sua coloração; eliminar odores derivados do sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) e; combater fungos e bactérias, substituindo o cloro. Porém possui melhor eficiência a temperaturas entre  $60^\circ\text{C}$  e  $80^\circ\text{C}$  (BORGES, 2012).

Para obter uma maior eficiência a temperaturas mais baixas (cerca de  $30^\circ\text{C}$ ), espécies conhecidas como *ativadores* são adicionadas à formulação. Eles interagem com o peróxido de hidrogênio liberado pelos percarbonatos e perboratos durante a lavagem produzindo oxidantes mais fortes (BURGESS, COKOJA, *et al.*, 2013).

Como pode ser observado na Figura 2.10, a reação da tetraacetililenodiamina (TAED), gera como produto o ácido peracético, uma molécula pequena de característica hidrofílica. Enquanto a reação com o nonanoil-oxibenzeno-sulfonato de sódio (NOBS) produz o ácido pernonanóico, considerado um alvejante hidrofóbico. Na formulação normalmente se utiliza uma

mistura desses dois compostos para ampliar o espectro da ação alvejante. O ácido pernanóico, por exemplo, atua mais especificamente em manchas oleosas, como maquiagem, podendo formar micelas como os surfactantes, ao passo que o ácido peracético não tem essa seletividade e é mais reativo à mesma temperatura (BURGESS, COKOJA, *et al.*, 2013).



**Figura 2.10** – Representação esquemática das reações da TAED (1) e NOBS (2) com o peróxido de hidrogênio (BURGESS, COKOJA, *et al.*, 2013).

Para aprimorar ainda mais a brancura dos tecidos após a lavagem, aditivos chamados *branqueadores ópticos* são utilizados. Dentre elas, o mais utilizado em detergentes domésticos é Tinopal<sup>®</sup>, nome do FWA (*fluorescent withening agent*) comercializado pela BASF S.A.

Ao ser adsorvido pelas fibras dos tecidos durante a lavagem, eles absorvem a luz ultravioleta, invisível para os olhos humanos, e emitem luz visível no mesmo comprimento de onda da cor azul. A luz azul emitida diminui a percepção da coloração amarelada, aumentando assim a brancura da roupa. A sua eficácia varia em função do tecido lavado e da sua concentração na água de lavagem, que é sempre muito baixa. Assim como os já apresentados *polímeros removedores de sujeira*, seus efeitos são acumulativos, aumentando a fluorescência dos tecidos a cada lavagem (Science in the Box, 2013).

Com a crescente aceitação dos detergentes sintéticos para lavagem de roupas nos anos 50 e 60, e por consequência, o aumento da concorrência, as empresas deste setor passaram a investir de forma pesada em pesquisa e

desenvolvimento de seus produtos. Além dos alvejantes, passaram a procurar novas moléculas que atuassem na quebra das moléculas de sujeira, assim como os alvejantes, para aumentar a eficiência de seus produtos. Assim, começaram a prestar atenção em outro setor concomitantemente em alta: o campo da enzimologia e biotecnologia.

### 2.2.5 Enzimas

Ao longo das décadas as enzimas têm sido um fator importante no desenvolvimento e aprimoramento de produtos detergentes. Na lavagem de louças e roupas, ou em limpezas de equipamentos e instrumentos da área odonto/médico-hospitalar, contribuem para a redução do tempo de lavagem, reduzindo o consumo de energia e água, diminuição das temperaturas de lavagem (já que a temperatura de maior eficiência gira em torno de 35°C), na redução do pH, além de outros efeitos que apenas as enzimas conferem aos tecidos. Elas são ambientalmente atrativas, uma vez que são derivadas de fontes renováveis (Science in the Box, 2013).

A evolução na genética e engenharia de proteínas nas últimas décadas, e atualmente, contribuem para melhorias conforme as necessidades do mercado, na estabilidade das enzimas na água de lavagem, na economia (Tabela 2.5), na sua especificidade entre substrato/produto e no potencial global de produtos contendo enzimas industriais.

Nos últimos 40 anos, as enzimas deixaram de ser um simples aditivo para se tornarem um ingrediente chave. Antes da introdução de dos detergentes modernos, o carbonato de sódio e o sabão eram os principais constituintes, e o efeito da limpeza durante a lavagem era dependente principalmente da ação mecânica nos tanques manuais (OLSEN e FALHOLT, 1998).

**Tabela 2.5** – Consumos durante a lavagem de roupas ao longo das décadas.

Consumo/Kg de detergente	1943-44 (manual)	1965 (máquina)	1975 (máquina)	1985 (máquina)	1990-95 (máquina)
Produtos Químicos (g)					
Convencionais	109	50	50	38-48	32
Novas tecnologias <sup>5</sup>	0	0	0	0	16-21
Água (L)	31	37	31	21	10-12
Energia para aquecimento da água (kWh)	1.45	0.6	0.4	0.25	0.2
Energia para motores e bombas (kWh)	0	0.4	0.2	0.15	0.1

Fonte: Olsen e Falholt (1998)

O advento da máquina de lavar trouxe uma redução considerável no consumo de produtos químicos. No período de 1967-1970, uma redução no consumo de energia de cerca de 40% foi provocada pela introdução bem sucedida dos detergentes enzimáticos. Em 1969, pelo menos 50% dos detergentes europeus estavam oferecendo o chamado “ataque biológico” (enzimas proteolíticas), o que resultou na economia de energia mostrada na Tabela 2.4. A diminuição da temperatura das lavagens de 95°C para 60°C, e depois 40°C, tornou-se mais comum. Assim como a necessidade de pré-lavagens e outras etapas, foram eliminadas (OLSEN e FALHOLT, 1998).

No Brasil, o primeiro detergente enzimático fabricado foi o Biotex<sup>®</sup>, da empresa Organon, em 1968. A fria recepção ao produto, contrastando com seu êxito no mercado holandês, não inibiu a Gessy Lever – nome adotado pela filial da Unilever no país – de lançar, pouco depois, o Biopresto<sup>®</sup>. Retirado do mercado em 1977, devido seu fracasso comercial, seguiu-se ainda outros, o detergente Viva<sup>®</sup>, comercializado pela Henkel, entre 1978 e 1984. A baixa aceitação dos detergentes enzimáticos se deu pelo alto custo do produto que exigia custosas embalagens resistentes à umidade e o próprio custo da enzima, levando o detergente enzimático a um preço duplicado em relação aos convencionais. Mas talvez o maior erro tenha sido o marketing equivocado. O foco em seu poder de tirar manchas de diversas naturezas passou ao consumidor a ideia de aditivo do sabão em pó convencional utilizando-o como uma etapa adicional de lavagem,

<sup>5</sup> Entende-se por novas tecnologias as enzimas, aprimoramentos e substituições dos ingredientes convencionais das primeiras formulações.

algo comum na época, e não como um detergente de emprego rotineiro (DE CASTRO, 2009).

A empresa Gessy Lever, novamente, estava convencida do mercado para os detergentes enzimáticos e introduziu em 1988 o Omo<sup>®</sup> Dupla Ação. Dessa vez, o marketing procurou evitar o erro anterior, sua campanha publicitária omitiu qualquer referência às enzimas, limitando-se a frase “ação biológica” no rótulo. Esse acerto do marketing combinado com a diminuição do custo da enzima, gerando um produto com preço de apenas 10% em relação aos convencionais, finalmente tornaram o detergente enzimático um sucesso de vendas no país (DE CASTRO, 2009).

Por outro lado, a introdução de enzimas nos detergentes elevaram os riscos de segurança e saúde ocupacional dos funcionários das fabricantes. Assim como muitas outras proteínas estranhas para o corpo humano, enzimas são potenciais agentes alérgicos. A inalação até mesmo de baixas concentrações na forma de pó ou aerossol pode estimular o corpo humano a produzir anticorpos. Em alguns indivíduos, o aumento das concentrações de anticorpos contra enzimas podem engatilhar o aumento das concentrações de histamina no sangue, causando sintomas como coriza, coceiras e até mesmo, quando exposto repetidamente, doenças respiratórias mais graves como asma e bronquite. Processo esse conhecido como “sensibilização”, considerado o maior risco de saúde dentro das indústrias de detergentes. Para evitar estes problemas, exames alérgicos são feitos de forma rotineira, ambientes são monitorados e máscaras respiratórias são utilizadas pelos funcionários (informação pessoal<sup>6</sup>). Laudos de institutos de pesquisa governamentais em diversos países, como o Conselho Nacional de Pesquisa dos Estados Unidos em 1971, e trabalhos como o de Hendricks (1970), concluíram que não há risco de obter sensibilização através das enzimas contidas no produto final.

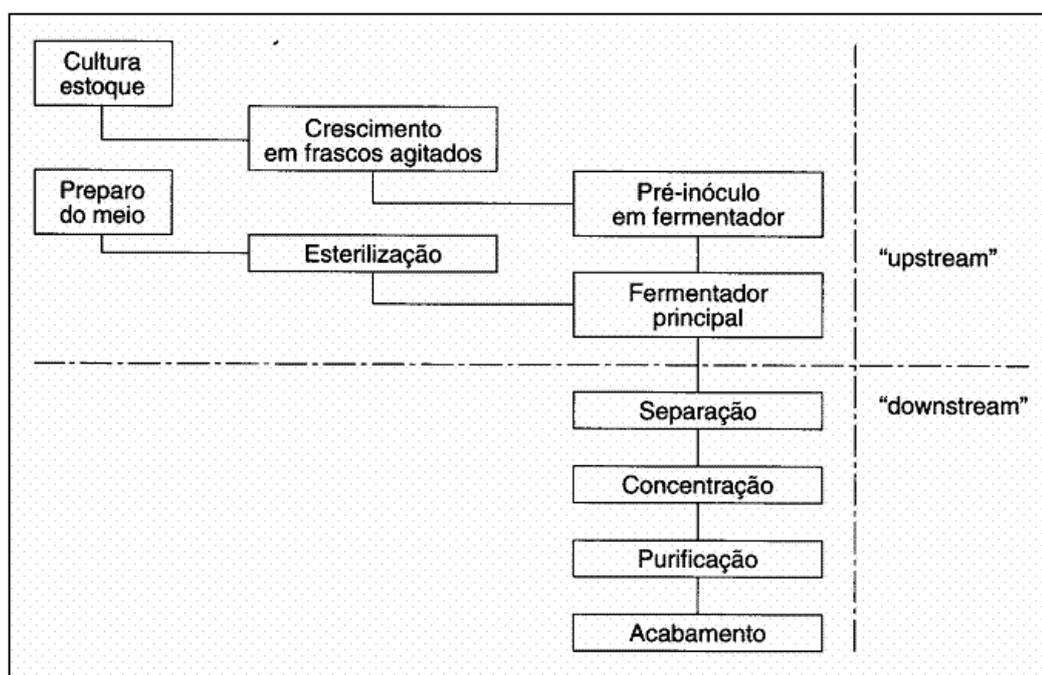
As fabricantes de enzimas como a Novo Nordisk (hoje Novozymes), a Genencor (filial da Dupont) e a Amano (líder japonesa em produção de enzimas), disponibilizam seus produtos na forma líquida ou então encapsulam as enzimas em polímeros que são dissolvidos no próprio produto, no caso de detergentes líquidos, ou na água de lavagem do consumidor final para detergentes em pó,

---

<sup>6</sup> Informações disponibilizadas pela gerente de segurança Juliana Falco da empresa Procter & Gamble.

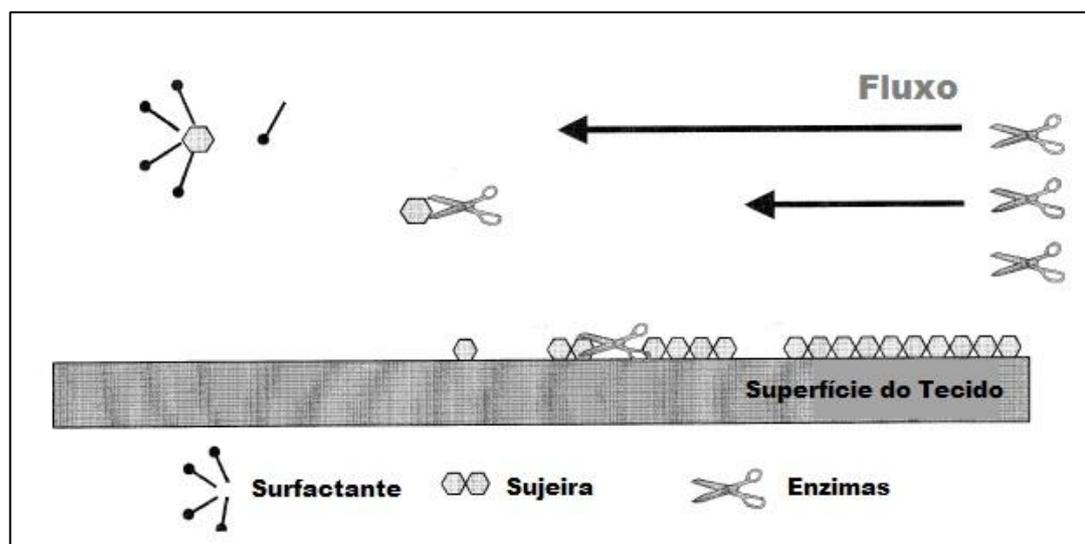
diminuindo o risco alérgico na fabricante de detergente e garantindo sua estabilidade.

Elas são produzidas através fermentações aeróbicas por batelada ou processo contínuo, em tanques de 20 a 1000 m<sup>3</sup>, cujo fluxograma está representado na Figura 2.11. No mosto são adicionados nutrientes esterilizados de milho, soja, açúcares e sais contendo nitrogênio e fósforo para prover os elementos básicos. As enzimas são extracelulares e seu processo de *downstream* se baseia inicialmente da separação sólido-líquido por filtração ou centrifugação, seguida pela concentração do sobrenadante através da evaporação do meio líquido, membranas de separação e cristalização, podendo ser pós-tratada para a forma granular ao ser encapsulada por polímeros (OLSEN e FALHOLT, 1998).



**Fig. 2.11** – Fluxograma simplificado da produção de enzimas microbianas por fermentação submersa (LIMA, AQUARONE, *et al.*, 2002).

Os tipos de enzimas produzidos para detergentes são as proteases, amilases, lipases e celulasas. Elas agem como catalisadores nas reações bioquímicas, decompondo estruturas moleculares complexas em estruturas mais simples, facilitando sua dissolução (Science in the Box, 2013), conforme mostrado na Fig. 2.12.



**Fig. 2.12** – Efeitos de limpeza das enzimas *in situ*. Reproduzido com modificações de Olsen e Falholt (1998).

### 2.2.5.1 Proteases

Representam cerca de 30% do total do comércio mundial de enzimas. Seu amplo uso estimulou o desenvolvimento de enzimas geneticamente modificadas, as quais são mais estáveis na presença de agentes oxidantes, mais resistentes a altas temperaturas e aos ambientes alcalinos (MERHEB, CABRAL, *et al.*, 2007).

Elas degradam impurezas de origem proteica como sangue, ovo, carne, suor humano, dentre outros. Proteases são classificadas de acordo com a sua origem (animal, vegetal ou microbiana), sua ação catalítica (endopeptidase ou exopeptidase), e a natureza de seu sítio catalítico. Conforme mostrado na Tabela 2.6, elas são caracterizadas por nomes comuns ou comerciais, sua faixa de pH e temperatura funcionais (OLSEN e FALHOLT, 1998).

Enzimas para detergentes normalmente são desenvolvidas em torno de fatores como estabilidade de oxidação, temperatura de maior atividade, autoproteólise, desnaturação, dureza da água, alcalinidade e custo (OLSEN e FALHOLT, 1998).

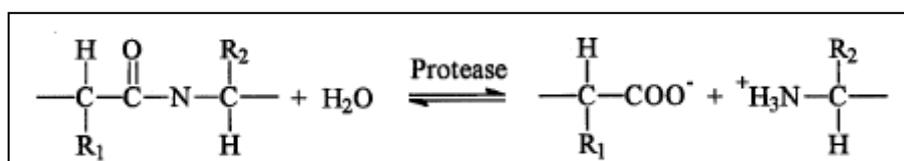
**Tabela 2.6** – Algumas das enzimas proteolíticas comerciais.

Nomes comerciais	Microorganismo	Estado do produto	Faixa funcional (pH)	Faixa funcional (°C)
Alcalase®	<i>Bacillus</i> spp.	Líquido/Granulado	6-10	10-80
Esperase®	<i>Bacillus</i> spp.	Líquido/Granulado	7-12	10-80
Everlase™	<i>Bacillus</i> OGM <sup>7</sup>	Líquido/Granulado	8-11	15-80
Savinase®	<i>Bacillus</i> OGM	Líquido/Granulado	8-11	15-75
Durazym®	<i>Bacillus</i> spp. OGM	Líquido/Granulado	8-11	15-70
Neutrase®	<i>Bacillus</i> spp.	Líquido/Granulado	6-8	10-65
Protamex™	<i>Bacillus</i> spp.	Microgranulado	6-8	10-65
Flavourzyme™	<i>Aspergillus</i> spp.	Líquido/Granulado	4-8	10-55

Fonte: Novo Nordisk S/A, Bagsvaerd, Denmark.

A Alcalase®, por exemplo, é estável em ambientes alcalinos. A Esperase® e a Savinase® foram desenvolvidas para ambientes fortemente alcalinos. Enquanto a Durazym® e a Everlase™ são muito estáveis à oxidação, como ambientes que contenham altas concentrações de alvejantes. A seleção de proteases para detergentes específicos é feita com base em testes de desempenho e estabilidade sobre certas condições padrões em conjunto com as formulações (OLSEN e FALHOLT, 1998).

Proteases catalisam a hidrólise da cadeia peptídica das proteínas como mostra a Figura 2.13. Dentre os parâmetros mais importantes para a cinética de reação estão o substrato S disponível na superfície do tecido (porcentagem de proteína), a proporção entre enzima e substrato em unidades de atividade por kilo de proteína (E/S), pH, tempo de reação e temperatura. Juntamente com a especificidade e propriedades da enzima em si, esses parâmetros são responsáveis pelo curso da reação em uma dada mancha de proteína (RAWLINGS, 2013).

**Figura 2.13** – Representação da hidrólise de proteínas catalisada (RAWLINGS, 2013).

<sup>7</sup> OGM – Organismos Geneticamente Modificados.

O critério quantitativo para a reação proteolítica é o grau de hidrólise ou atividade hidrolítica. O grau de hidrólise é calculado determinando o número de ligações peptídicas clivadas e o total de ligações peptídicas na molécula de proteína intacta. Enquanto a atividade hidrolítica é definida como miliequivalentes (meq) de NaOH consumidos em uma relação de pH por massa de substrato em um dado período de tempo (RAWLINGS, 2013).

Porém, em aplicações em detergentes, a concentração de substrato é muito baixa e difícil de medir. Para então quantificar o desempenho das enzimas são feitos ciclos de lavagens com as formulações de detergentes contendo diferentes concentrações enzimáticas em manchas previamente simuladas com grandes concentrações de substratos, como sangue e carne para as proteases, gordura para lípases e amido para as amilases. A quantificação do desempenho de um detergente será mais bem explicada no capítulo 3.

Algo curioso está em como manter a estabilidade de uma molécula que pode se autodigerir ou degradar outras enzimas, como é o caso da protease. Em detergentes em pó, onde a protease está na forma granulada e encapsulada, todas as enzimas são estáveis na ausência da água. Diferentemente do ambiente aquoso nos detergentes líquidos, no qual inibidores como glicerina, propilenoglicol e polietilenoglicol são usados com o ácido bórico para evitar a autodigestão das próprias proteases ou a degradação das outras enzimas contidas na formulação. O íon borato ( $\text{BO}_3^{3-}$ ) funciona como um inibidor reversível interagindo com os grupos dos sítios ativos das proteínas. Uma vez na água de lavagem, esses inibidores são diluídos e a atividade das enzimas volta a ser como era antes (OLSEN e FALHOLT, 1998).

#### 2.2.5.2 Amilases

Amilases facilitam a remoção das manchas de amido, tais como massas, arroz, batata, molho, chocolate, pudim e comidas para bebês. A gelatinização,

que é o inchaço da molécula de amido pela água, afeta a susceptibilidade à limpeza por surfactantes. Esses diferentes graus de gelatinização são resultados do tempo e temperatura de cozimento desta determinada mancha de alimento presente na roupa. Se o processo de cozimento não exceder a temperatura de gelatinização, as moléculas de amido podem permanecer em uma forma de grânulos, uma forma compacta que dificulta a atuação dos surfactantes. A presença das amilases torna este fator superfluo, quebrando o amido em menores partículas e facilitando a sua retirada das fibras do tecido (OLSEN e FALHOLT, 1998). Porém sua catálise é acelerada quando o amido está em estado gelatinizado (EDITORA INSUMOS, 2010).

Importantes  $\alpha$ -amilases industriais são produzidas através das espécies *Bacillus* e *Aspergillus*. A Tabela 2.7 apresenta as condições para aplicações e algumas características comparativas para as amilases comercializadas pela Novo Nordisk – atual Novozymes.

**Tabela 2.7** - Algumas amilases comerciais e suas características.

Nomes comerciais	Microorganismo	Estado do produto	Faixa funcional (pH)	Faixa funcional (°C)
Termamyl®	<i>Bacillus</i> spp. OGM	Líquido/Granulado	6-11	25-100
Duramyl®	<i>Bacillus</i> spp. OGM	Líquido/Granulado	6-10	25-100
BAN	<i>Bacillus</i> spp.	Líquido/Granulado	5-8	15-90
Fungamyl®	<i>Aspergillus</i> spp.	Líquido/Granulado	4-7	15-60

Fonte: Novo Nordisk S/A, Bagsvaerd, Denmark.

Dentre as enzimas da tabela, podemos perceber que a Fungamyl® é relevante para detergentes cujo uso seja de baixo pH, sendo normalmente utilizada na limpeza industrial de equipamentos. A Duramyl® é a mais comumente utilizada para detergentes domésticos. Ela foi desenvolvida para ser estável à oxidação em ambientes úmidos, como em detergentes em pó que contenham umidade. Mas de uma forma geral, na prática, elas são selecionadas com base em seu desempenho e testes de estabilidade nos detergentes em fase de formulação (OLSEN e FALHOLT, 1998).

Durante a dissolução enzimática as ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas são hidrolizadas de forma randômica, reduzindo assim a viscosidade do amido

gelatinizado e aumentando a sua solubilidade ao convertê-lo primeiramente em oligossacarídeos, contendo entre 6 a 8 moléculas de glicose, e, posteriormente, açúcares redutores como a maltose, todos solúveis em água. A atividade da enzima decresce rapidamente quanto menor for o grau de polimerização do substrato (EDITORA INSUMOS, 2010).

O amido gelatinizado, dependendo do seu teor de amilose, pode formar uma película no tecido que funciona como uma cola para outras sujeiras. Essas manchas de amido combinadas com outras sujeiras dificultam ainda mais a sua remoção. Como resultado, peças de roupas brancas tornam-se cada vez mais cinzas a cada ciclo de lavagem. Desta forma, as amilases podem manter ou até mesmo contribuir para o aumento do clareamento de tecidos sujos e inibir o envelhecimento do tecido branco resultante da combinação entre amido e partículas de sujeira (OLSEN e FALHOLT, 1998).

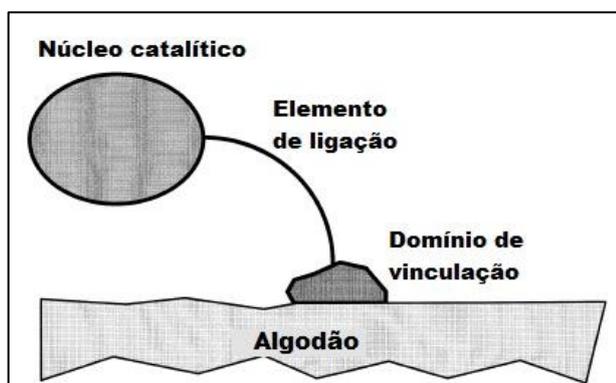
### 2.2.5.3 Celulases

As primeiras celulases a serem utilizadas em detergentes foram as chamadas *color clarification cellulases*, ou traduzindo, celulases de rejuvenescimento das cores (informação pessoal<sup>8</sup>). Essas enzimas quebram ligações  $\beta$ -1,4-glucosídicas da celulose e operam diretamente nas fibras naturais do algodão ou nas porções que contenham celulose dos tecidos sintéticos. Sua classificação está dividida entre endocelulases (endoglucanase – EG) e exocelulases (celobiohidrolase – CBH). A CBH ainda pode ser dividida entre enzima do tipo I (CBH I), que hidrolisa terminais redutores, enquanto que a do tipo II (CBH II) hidrolisa terminais não redutores (DE CASTRO e PEREIRA, 2010).

As moléculas de celulase são compostas por 3 domínios funcionalmente distintos. O primeiro é o núcleo, um domínio esférico onde se encontra o sítio catalítico. O segundo é um elemento de ligação alongado e flexível que se projeta para fora do núcleo e, por último, uma pequena esfera que vincula o substrato à enzima (Figura 2.14) (OLSEN e FALHOLT, 1998).

---

<sup>8</sup> Procter & Gamble. Raw Material and Technology Training. Informação fornecida no treinamento interno para funcionários da empresa. 2013.



**Figura 2.14** – Representação da molécula de celulase. Reproduzido com modificações de Olsen e Falholt (1998).

As propriedades catalíticas, tal como sua atividade *endo* ou *exo*, a especificidade com o substrato e os tipos de produtos de reação que são formados, são determinadas pela natureza do núcleo. A presença do domínio de vinculação é de particular importância para a ligação sobre a região cristalina da celulose (DE CASTRO e PEREIRA, 2010). As principais celulases comerciais estão apresentadas na Tabela 2.8.

**Tabela 2.8** – Algumas amilases comerciais e suas características.

Nomes comerciais	Microorganismo	Estado do produto	Faixa funcional (pH)	Faixa funcional (°C)
Celluzyme <sup>®</sup>	<i>Humicola</i> spp.	Líquido/Granulado	4-10	25-70
Carezyme <sup>®</sup>	<i>Humicola</i> spp.	Líquido/Granulado	5-10.5	25-70

Fonte: Novo Nordisk S/A, Bagsvaerd, Denmark.

A Celluzyme<sup>®</sup> é uma mistura mais complexa de enzimas que contém ao menos 7 celulases (2 CBH e 5 EG), enquanto a Carezyme<sup>®</sup> é monocomposta (OLSEN e FALHOLT, 1998). As duas, neste caso, são produzidas através do fungo *Humicola*, mas também podem ser produzidas pelas bactérias *Aspergillus niger* retidas em biofilmes, ou através de fermentações de estado sólido e submersa (GAMARRA, VILLENA e GUTIERREZ-CORREA, 2010). Elas recuperam e mantêm as cores dos tecidos, além de torná-lo mais liso e macio.

Proporcionam esses efeitos ao quebrarem as fibras expostas nos tecidos de algodão que são gerados pelo desgaste natural e pela lavagem (OLSEN e FALHOLT, 1998). Evitam também a formação daquelas famosas “bolinhas” de fibrilas que ficam presas aos fios (informação pessoal<sup>9</sup>).

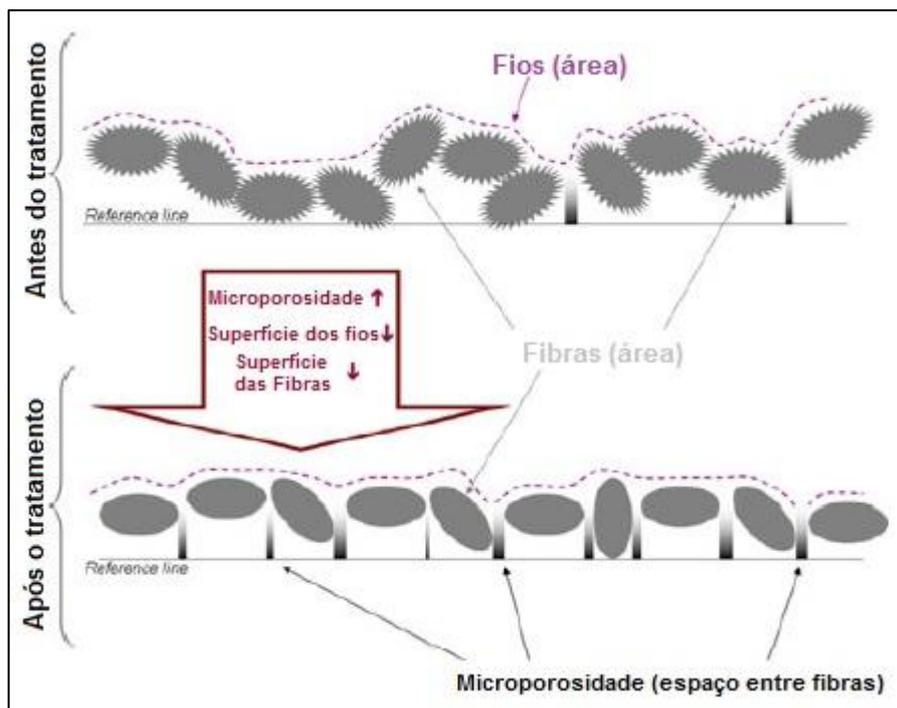
Recentemente, uma nova preparação de enzimas do tipo celulase, desenvolvida pela Novozymes, tem atraído o estudo e a sua utilização nos detergentes sintéticos. Com o nome comercial de Celluclean<sup>®</sup> (abreviado como CCE), promete entregar a remoção de manchas de betaglucanas, por exemplo, manchas de aveia, e impedindo sua redeposição. Essas manchas, assim como o amido, podem formar um filme na superfície do tecido que retém a sujeira, tornando-o acinzentado. Desta forma, esta nova preparação de enzimas também preserva o pigmento real dos tecidos (CALVIMONTES, LANT e DUTSCHK, 2011).

Os níveis típicos de CCE ativo na formulação do detergente estão entre 0,001% e 0,007%, permanecendo na solução de lavagem em concentrações entre 0,0000008% e 0,000056%, dependendo do volume da máquina de lavar. Apesar de concentrações aparentemente pequenas, os efeitos do CCE sobre os tecidos são acumulativos a cada ciclo de lavagem, como mostra a Figura 2.15, gerando uma exposição cada vez maior dos fios à enzima (CALVIMONTES, LANT e DUTSCHK, 2011).

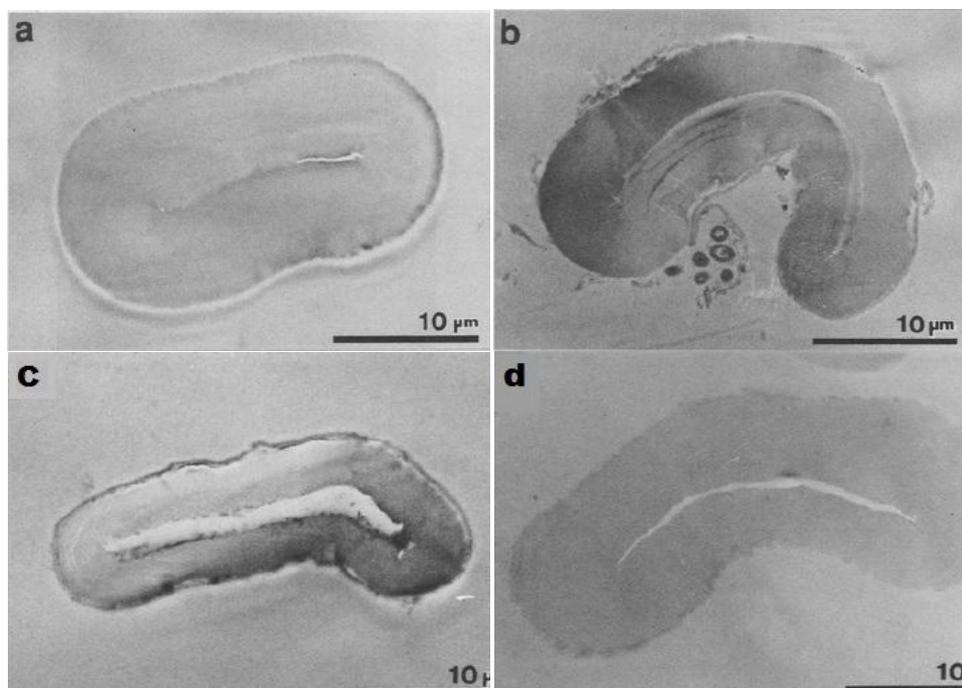
Os efeitos da enzima podem até mesmo duplicar a eficiência de lavagem ao abrir microporos no tecido, diminuindo a área superficial dos fios e fibras, aumentando a entrada de água e dos componentes do detergente, e facilitando a remoção da sujeira retida em regiões mais profundas dos tecidos (CALVIMONTES, LANT e DUTSCHK, 2011).

---

<sup>9</sup> Anotações das aulas de Enzimologia da Escola de Engenharia Lorena, disciplina ministrada pelo Prof<sup>o</sup> Dr. André Ferraz.



**Figura 2.15** – Efeito da enzima após quatro ciclos de lavagem: espaços entre as fibras são abertos, o perfil dos fios está mais alinhado e as fibras do algodão tornam-se mais suaves. Reproduzido com modificações de Calvimontes, Lant e Dutschk (2011).



**Figura 2.16** – Microscopia eletrônica de transmissão dos cortes transversais ultrafinos das fibras de algodão de uma camisa utilizando tetróxido de ósmio para coloração; a, limpa; b, suja naturalmente; c, lavada com detergente contendo protease; e d, lavada com detergente contendo celulase (MURATA, HOSHINO, *et al.*, 1991).

Os primeiros trabalhos relacionados à utilização de celulasas em detergentes foram os de Murata (1991). Estes trabalhos não apenas comprovam os efeitos da celulase na eficiência de limpeza dos fios (Figura 2.16) como, também, mostram que até mesmo a utilização de grandes concentrações dessas enzimas não afeta de nenhuma maneira a estrutura dos fios, bem como sua resistência e qualidade do tecido. Isso se deve ao fato de que as enzimas não conseguem penetrar tão profundamente nos fios a ponto de afetar o seu centro, chamado também de lúmen, responsável pelas propriedades físicas do tecido.

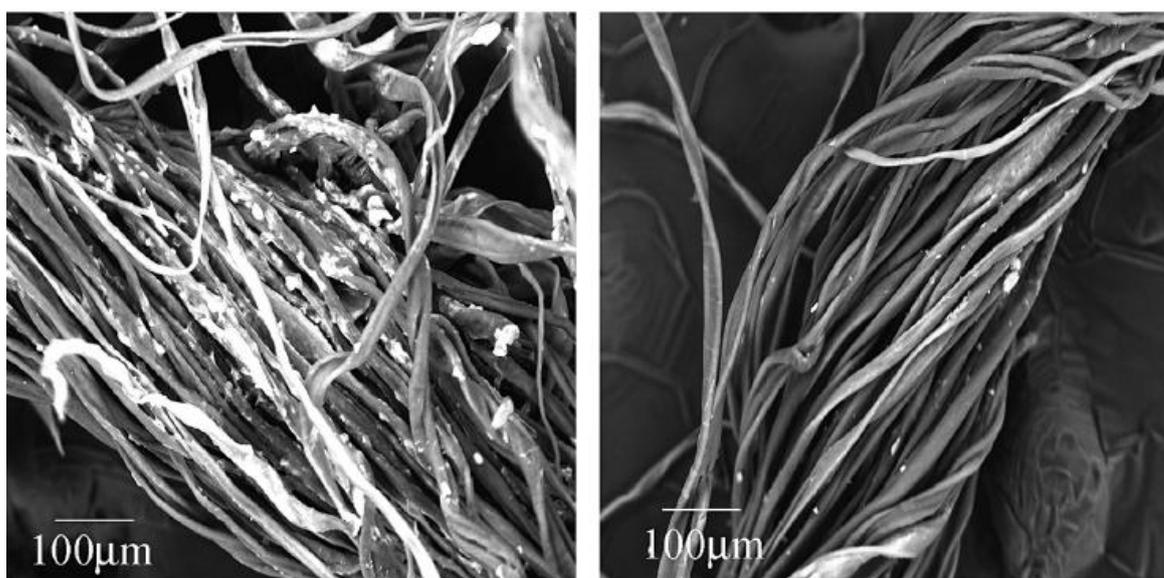
#### 2.2.5.4 Lipases

Por causa de sua forte hidrofobicidade, gorduras e óleos (triglicerídeos) são difíceis de remover em baixas temperaturas. As lipases hidrolisam triglicerídeos em moléculas mais hidrofílicas como mono e diglicerídeos, ácidos graxos livres, e glicerol. Estes produtos de hidrólise são todos solúveis em meio alcalino. Em pH maior que 8, a reação de hidrólise pode ainda ser favorecida por pequenas quantidades de íons de cálcio livres – aqueles responsáveis pela dureza da água – que se combinam com as gorduras presentes na roupa e formam um sabão de cálcio (OLSEN e FALHOLT, 1998).

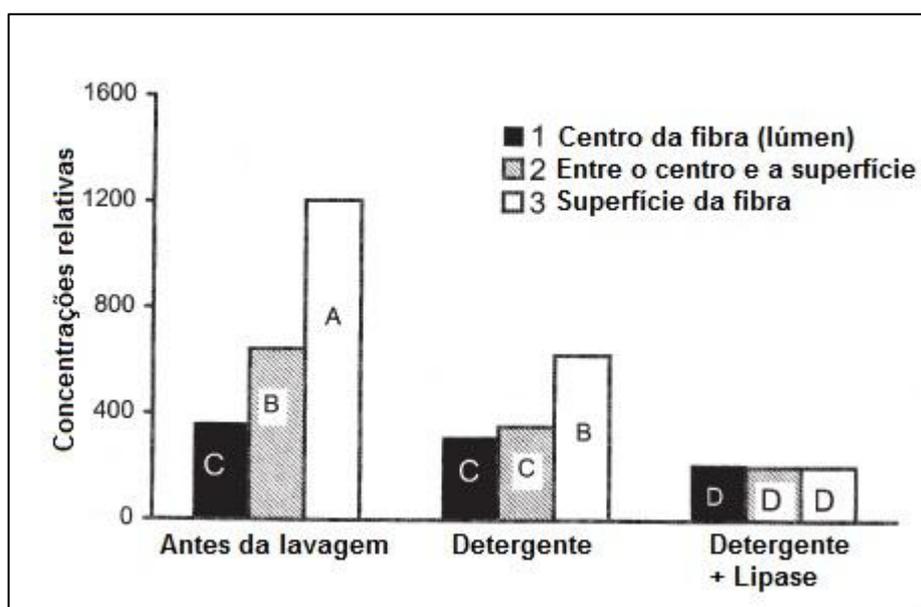
A primeira lipase comercialmente aplicada em detergentes foi a Lipolase<sup>®</sup>, introduzida em 1988 em detergentes japoneses. As marcas líderes na Europa e Estados Unidos incluíram lipases na formulação a partir de 1990/91. A Lipolase<sup>®</sup> foi isolada pela primeira vez a partir do fungo *Humicola lanuginosa* para posteriormente ser obtida pela bactéria *Aspergillus spp.* geneticamente modificada após a extração do código genético para a produção da lipase do fungo. Os efeitos da lipase só são percebidos após vários ciclos de lavagem, chamado também de “desempenho de lavagem multiciclo”, e é este ponto que os fabricantes de enzimas estão estudando para aprimorar (OLSEN e FALHOLT, 1998).

O desafio hoje é o desenvolvimento de lipases cuja eficiência possa ser perceptível já no primeiro ciclo de lavagem. Engenheiros da Novozymes melhoraram este cenário ao alterar um dos aminoácidos do sítio catalítico da

Lipolase<sup>®</sup> - a substituição do ácido aspártico da posição nº 96 pela leucina – para fazer o sítio catalítico mais hidrofóbico e melhorar sua afinidade com a superfície têxtil (OBENDORF, VARANASI, *et al.*, 2001). Sua eficiência está demonstrada na Figura 2.17 e Figura 2.18.



**Figura 2.17** – Microscopia eletrônica das seções longitudinais dos fios de um tecido de algodão lavados com detergente comum (esquerda) e com detergente contendo lipase (direita) (OBENDORF, VARANASI, *et al.*, 2001).



**Figura 2.18** – Concentrações relativas de óleo residual de um tecido sujo com gordura lavado com e sem lipase (as letras indicam uma determinada faixa de concentração residual) (OBENDORF, VARANASI, *et al.*, 2001).

### 2.3 O Planejamento de Experimentos

Dentro da indústria, em especial no desenvolvimento do produto, muitas vezes é necessário obter informações sobre produtos e processos empiricamente, isto é, em fatos que se apoiam somente em observações, nas experiências vividas. Neste momento, para a resolução do problema, o trabalho dessas pessoas envolvidas assemelha-se ao de pesquisadores ou cientistas que precisam projetar experimentos, coletar dados e analisá-los. Experimentos são empregados para resolver problemas de fabricação, decidir entre diferentes processos de manufatura, diferentes conceitos de produto, entender a influência de determinados fatores, dentre milhares de outros. Além disso, esta tarefa torna-se cada vez mais importante na medida em que novas tecnologias são apresentadas e quando as exigências governamentais e dos clientes são intensificadas, aumentando a necessidade de emprego de experimentos durante todas as etapas do ciclo de vida do produto (AMARAL, 1999).

O Planejamento de Experimentos (em inglês *Design of Experiments*, DOE) é uma técnica utilizada para, obviamente, planejar-se experimentos, ou seja, definir quais dados e em quais quantidades e condições devem ser coletados em um determinado experimento, buscando satisfazer dois grandes objetivos: a maior precisão possível na resposta e o menor custo. É uma técnica considerada de extrema importância na indústria já que seu emprego permite resultados mais confiáveis, economizando dinheiro e tempo (MONTGOMERY, 1976).

Entretanto, deve-se ficar claro que esta ferramenta não substitui o conhecimento técnico do especialista da empresa sobre o assunto e nem mesmo trata-se de uma “receita de bolo” de como realizar experimentos. O conhecimento do problema juntamente com a técnica que permitirá bons planejamentos, tornando-os mais rápidos, de menor custo e que possibilitem atingir a resposta esperada (AMARAL, 1999).

Aparentemente novas, as principais técnicas de planejamento de experimentos já existem há muitos anos, contudo, devido à maioria dessas técnicas requererem uma quantidade exaustiva de cálculos, tornou-se mais fácil utilizá-las após o desenvolvimento das ferramentas computacionais de análise estatística (AMARAL, 1999).

O método mais comumente utilizado até então para o desenvolvimento de produtos e processos era o chamado “*One Variable At a Time*”, ou OVAT, traduzido como “Uma Variável por Vez” (LEARDI, 2009). Suponha-se que seja necessário otimizar uma reação química, encontrando a configuração para produzir o maior rendimento possível, cujas principais variáveis envolvidas são temperatura e tempo de reação. Utilizando o método OVAT, fixa-se o tempo de reação em um determinado valor e realizam-se os experimentos variando a temperatura dentro de um intervalo previamente escolhido através do conhecimento teórico ou empírico. Após a análise dos dados desta primeira rodada de experimentos, fixa-se o valor da temperatura a qual se obteve o maior rendimento, e realiza-se uma segunda rodada variando agora o tempo de reação. Com isso, espera-se obter os valores de temperatura e tempo de reação que geram o rendimento máximo.

A maioria das pessoas concordaria com a lógica e a resposta obtida pelo primeiro pelo método OVAT. Uma pesquisa feita por Leardi (2009) em todos os artigos publicados na revista *Analytica Chimica Acta* em 2009 (do volume 631 ao 645, junto com os artigos disponíveis no “Articles in Press”, seção de Junho de 2009) aponta que, dos 165 artigos envolvendo as palavras-chave “optimization”, “development”, “improvement”, ou “effect of”, apenas 11 artigos utilizaram o planejamento de experimentos, enquanto que nos 154 artigos restantes a “optimization” foi efetuada através do método OVAT.

Infelizmente, o método OVAT não garante que a resposta máxima será atingida. Essa abordagem só seria válida se as variáveis fossem totalmente independentes uma das outras, dizendo de outra forma, sem interações entre elas (LEARDI, 2009).

Dúvidas como: qual a melhor configuração de um carro de corrida, de um time titular de futebol ou até o tempo ideal para um bolo permanecer no forno, normalmente retornam como resposta a palavra “depende”. Isso significa que a melhor configuração de um carro de corrida, por exemplo, depende dos níveis de vários outros fatores envolvidos, como o tipo da pista, o circuito e até mesmo as condições climáticas. Toda vez que a resposta for “depende”, significa que a pessoa que a respondeu reconhece de forma intuitiva o efeito dos fatores envolvidos, que as interações entre eles são relevantes, e que não levar isso em consideração pode acarretar em resultados ruins. É claro que nunca se ouvirá de

uma dona de casa a palavra “interação”, mas seu comportamento demonstra claramente que ela entende o significado dessa palavra ao colocar um bolo para assar.

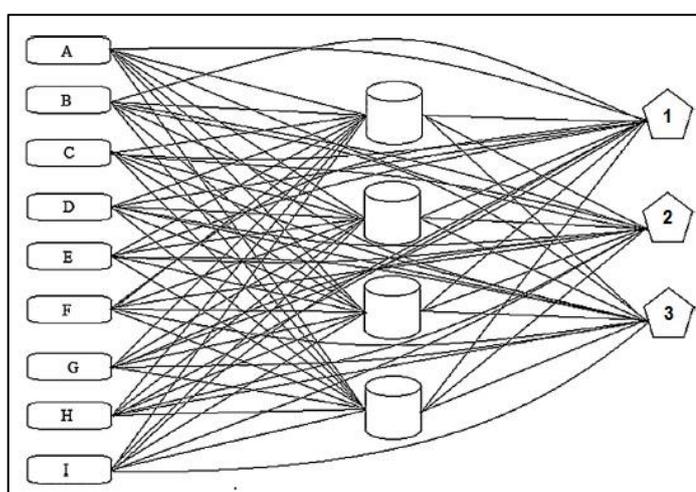
Ao variar um fator por vez, encontra-se a “melhor” temperatura para um tempo de reação fixo, enquanto, na verdade, cada tempo de reação tem uma temperatura ótima diferente. Outra diferença entre o OVAT e o DOE é o fato de que o primeiro método decide qual será o próximo experimento com base nos experimentos anteriores, enquanto que no segundo já se tem planejado anteriormente todo o conjunto de experimentos em uma matrix simples, cobrindo todo o domínio experimental, o que promove um conhecimento global de toda a reação (LEARDI, 2009).

Para efetuar um planejamento de experimentos, cinco passos devem ser considerados: I) Definir o objetivo dos experimentos. Embora possa parecer totalmente absurdo, muitas pessoas começam a fazer experiências sem ter claro em suas mentes o motivo pelo qual as estão fazendo. Uma vez que você obtém resultados, poderá extrair informações a partir deles, e quanto maior o número de resultados (experimentos), melhor; II) Detectar todos os fatores que podem afetar o resultado que se deseja, também chamado de “resposta”. No entanto, cuidado com a diferença entre os fatores que “podem” afetar a resposta e aqueles que realmente afetam. Os fatores selecionados devem ter embasamento em fatos científicos; III) Planeje os experimentos. Levando em consideração os fatores selecionados, a definição de seus intervalos e o modelo a ser aplicado; IV) Realize os experimentos. Na forma clássica de se pensar, esta seria a parte mais importante do processo, mas do ponto de vista do planejamento de experimentos esta etapa é apenas algo que não pode ser evitada, a fim de se obter os resultados que serão utilizados para construir o modelo; V) Analise os dados obtidos dos experimentos. Este passo transforma números em informações e é a conclusão lógica de todo o processo (LEARDI, 2009).

### 2.3.1 Como variar tudo ao mesmo tempo

Um dos problemas mais comuns de quem faz experimentos é determinar a influência de uma ou mais variáveis sobre outra variável de interesse. No linguajar

estatístico, o interesse está em descobrir como a resposta depende dos fatores. Podemos abordar esse problema como um caso particular da situação mostrada esquematicamente na Figura 2.19. Um certo número de fatores A, B, C...I, atuando sobre o sistema em estudo, produz as respostas 1, 2 e 3. O sistema atua como uma função – desconhecida a princípio, caso contrário não seria necessário tantos experimentos – que opera sobre as variáveis de entrada (fatores) e produz como saída as respostas observadas (BRUNS, SCARMINIO e NETO, 2010).



**Figura 2.19** – Representação de um sistema ligando as variáveis de entrada às variáveis de saída. Reproduzido com modificações de Martín e Martínez (2012).

O objetivo da pessoa que realiza experimentos é descobrir essa função ou ao menos obter uma aproximação satisfatória para ela, entendendo melhor a natureza da reação em estudo e escolher as melhores condições de operação do sistema.

Segundo Montgomery (1976), existem dezenas de modelos de planejamento. Dentre os mais utilizados estão o Tratamento em Pares, Tratamento em Blocos, Quadrado Latino, Quadrado Greco-Latino, Quadrado Hiper-Greco-Latino e os Experimentos Fatoriais.

Dos citados acima, cabe ressaltar o modelo dos experimentos fatoriais. Para fazer um planejamento fatorial completo devemos realizar experimentos (também chamados de *ensaios*) em todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores. Podemos dividir os planejamentos fatoriais entre  $2^k$ ,  $3^k$ ,  $4^k$  e assim por diante, onde  $k$  representa o número de fatores (MONTGOMERY, 1976). Por

exemplo, suponha-se que seja necessário efetuar um estudo do rendimento de uma determinada reação química, onde um estudo prévio forneceu três fatores que afetam a resposta: temperatura, catalisador e concentração. Foram então selecionados os níveis dos fatores a serem estudados: I) Temperatura, entre 40°C e 60°C; II) Catalisador A e B; e III) Concentração dos reagentes entre 1,0M e 1,5M. Um planejamento de 2 níveis com três variáveis é chamado de planejamento  $2^3$ . Para realizar o chamado planejamento fatorial completo são necessários então oito experimentos ( $2^3 = 8$ ), englobando todas as possibilidades de ensaios, conforme mostrado na Tabela 2.9.

**Tabela 2.9** – Exemplo de uma matriz de planejamento fatorial  $2^3$ .

Ensaio	Temperatura	Catalisador	Concentração
1	40°C	A	1,0 M
2	60°C	A	1,0 M
3	40°C	A	1,5 M
4	60°C	A	1,5 M
5	40°C	B	1,0 M
6	60°C	B	1,0 M
7	40°C	B	1,5 M
8	60°C	B	1,5 M

Nos planejamentos de dois níveis, costuma-se identificar os níveis superior e inferior com os sinais (+) e (-), respectivamente. A atribuição desses sinais também pode ser feita para os níveis dos fatores qualitativos. Em nosso exemplo, vamos admitir que o nível (+) corresponde ao catalisador B. A escolha é arbitrária e não afeta as conclusões. Suponha-se também que os oito ensaios foram realizados de duplicatas, e a média dos mesmos geraram as seguintes respostas, descritas na Tabela 2.10. Os ensaios estão dispostos na chamada *ordem-padrão*. Todas as colunas começam com o nível (-) e depois os sinais vão se alternando. Um a um na primeira coluna, depois dois a dois, e finalmente quatro sinais negativos e quatro positivos na terceira coluna. Se houvesse um quarto fator, a coluna correspondente teria oito sinais negativos e, em seguida, oito sinais mais, já que o número total de fatores seria 16 ( $2^4=16$ ). Para um planejamento com  $k$  fatores, a última coluna tem  $2^{k-1}$  sinais negativos e depois  $2^{k-1}$  sinais positivos.

Lembrando-se disso, podemos escrever facilmente a matriz de planejamento de qualquer fatorial de dois níveis (BOX, HUNTER e HUNTER, 1978).

**Tabela 2.10** – Resultados de uma matriz de planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.

Fatores		(-)	(+)		
1:	Temperatura (°C)	40	60		
2:	Catalisador (tipo)	A	B		
3:	Concentração (M)	1,0	1,5		

Ensaio	Temperatura	Catalisador	Concentração	Rendimento (média)
1	-	-	-	54,0
2	+	-	-	86,5
3	-	+	-	48,0
4	+	+	-	63,0
5	-	-	+	63,0
6	+	-	+	93,5
7	-	+	+	58,5
8	+	+	+	72,0

Fonte: Exercício proposto por Bruns, Scarminio e Neto (2010) para o cálculo dos efeitos principais e das interações entre os fatores.

Neste exemplo, quando fixamos a concentração e utilizamos o catalisador A e eleva-se a temperatura de 40°C para 60°C o rendimento da reação sofre um aumento de 32,5%. Quando o catalisador é do tipo B, o rendimento sobre apenas 15%. Isso mostra que o efeito da temperatura, ou seja, o que acontece com o rendimento da reação ao elevarmos a temperatura de 40°C para 60°C, depende do nível em que o catalisador está. Assim como o efeito do catalisador também depende do nível da temperatura. Quando o efeito de uma variável depende de outra, como neste caso, dizemos que as duas variáveis interagem (BRUNS, SCARMINIO e NETO, 2010).

O chamado *efeito principal* da temperatura é, por definição, a média dos efeitos deste fator nos dois níveis dos demais fatores, no caso catalisador e concentração. Definimos portanto, que o efeito da temperatura pode calculado da seguinte forma:

$$T = \bar{y}_+ - \bar{y}_- \quad \therefore$$

$$T = \left( \frac{y_2 + y_4 + y_6 + y_8}{4} \right) - \left( \frac{y_1 + y_3 + y_5 + y_7}{4} \right) \therefore$$

$$T = \left( \frac{86,5 + 63 + 93,5 + 72}{4} \right) - \left( \frac{54 + 48 + 63 + 58,5}{4} \right) = 22,875\%$$

Este valor indica que o rendimento da reação sobe 22,875%, em média, quando a temperatura passa de seu nível inferior (40°C) para o nível superior (60°C). Porém, como acabamos de ver, os três fatores interagem, e não devemos falar do efeito da temperatura sem dizer algo sobre o tipo de catalisador e a concentração. Precisamos na verdade, interpretar os efeitos dos dois fatores conjuntamente, para não deixar dúvidas sobre a interação que existe entre eles. Como vimos anteriormente, quando utilizamos o catalisador A, mantemos a concentração e elevamos a temperatura, o acréscimo no rendimento é de 32,5%, ao passo que com o catalisador B é de apenas 15%. Como na ausência de interação esses dois valores deveriam ser idênticos, podemos tomar a diferença entre eles como uma medida da interação entre os fatores T e C. A metade desta diferença entre eles, portanto, é o chamado *efeito de interação* entre T e C (BRUNS, SCARMINIO e NETO, 2010). Como caracterizamos o catalisador B como sendo (+) e utilizando TC para representar este efeito, podemos escrever:

$$TC_1 = \left( \frac{15 - 32,5}{2} \right) = -17,5\%$$

Note que o efeito deste cálculo abrange somente a concentração fixa de 1,0M (-). Se este planejamento fosse um 2<sup>2</sup> (somente duas variáveis), a interação entre temperatura e catalisador seria -17,5%. Isso significa que quando trocamos o catalisador A pelo o catalisador B, o rendimento cai 17,5% em média. Se na escolha dos sinais tivesse sido invertida, colocando o catalisador A como nível superior, o efeito teria sido igual a +17,5%. Na prática, a conclusão é a mesma: há uma diferença entre os rendimentos obtidos com os dois catalisadores, e os resultados do catalisador B são, em média, 13,5% mais baixos.

Porém, para calcularmos o real efeito TC levando em consideração também a concentração, é necessário fazer a diferença entre TC<sub>1</sub> e TC<sub>2</sub>, sendo este último calculado para a concentração no nível superior (1,5M). Vemos então

que quanto maior o número de variáveis, mais sucessível a erros se torna o cálculo das interações. Para um planejamento fatorial  $2^3$  temos o equivalente a quatro tipos de interações possíveis entre os três fatores (BOX, HUNTER e HUNTER, 1978), neste exemplo: I) temperatura e catalisador; II) temperatura e concentração; III) catalisador e concentração; e por último a interação entre os 3 fatores IV) temperatura, catalisador e concentração.

Para facilitar as contas, é utilizada a chamada *matriz de coeficientes de contraste* (MONTGOMERY, 1976). Começamos reescrevendo a matriz de planejamento para os três efeitos principais 1 (temperatura), 2 (catalisador) e 3 (concentração).

$$\begin{array}{ccc|ccc}
 \mathbf{T} & \mathbf{C} & \mathbf{C} & \mathbf{1} & \mathbf{2} & \mathbf{3} \\
 \hline
 40 & A & 1,0 & -1 & -1 & -1 \\
 60 & A & 1,0 & +1 & -1 & -1 \\
 40 & B & 1,0 & -1 & +1 & -1 \\
 60 & B & 1,0 & +1 & +1 & -1 \\
 40 & A & 1,5 & -1 & -1 & +1 \\
 60 & A & 1,5 & +1 & -1 & +1 \\
 40 & B & 1,5 & -1 & +1 & +1 \\
 60 & B & 1,5 & +1 & +1 & +1
 \end{array} = \begin{array}{ccc}
 -1 & -1 & -1 \\
 +1 & -1 & -1 \\
 -1 & +1 & -1 \\
 +1 & +1 & -1 \\
 -1 & -1 & +1 \\
 +1 & -1 & +1 \\
 -1 & +1 & +1 \\
 +1 & +1 & +1
 \end{array}$$

Agora acrescentaremos a essa matriz uma coluna de sinais positivos – a primeira – e outras quatro, denominadas 12, 13, 23 e 123. Cada uma dessas colunas representará as quatro interações entre os fatores, cujos sinais serão os produtos, elemento a elemento, dos sinais de suas respectivas colunas. Por exemplo, a coluna 12 será o produto dos sinais entre a coluna 1 e a coluna 2.

$$\begin{array}{cccccccc}
 \mathbf{I} & \mathbf{1} & \mathbf{2} & \mathbf{3} & \mathbf{12} & \mathbf{13} & \mathbf{23} & \mathbf{123} \\
 \hline
 + & - & - & - & + & + & + & - \\
 + & + & - & - & - & - & + & + \\
 + & - & + & - & - & + & - & + \\
 + & + & + & - & + & - & - & - \\
 + & - & - & + & + & - & - & + \\
 + & + & - & + & - & + & - & - \\
 + & - & + & + & - & - & + & - \\
 + & + & + & + & + & + & + & +
 \end{array}$$

Para calcular os efeitos a partir da matriz, escolhemos a coluna apropriada, aplicamos seus sinais às respostas correspondentes (os rendimentos obtidos), fazemos a soma algébrica e finalmente dividimos o resultado pela metade da quantidade de ensaios. No caso de um planejamento  $2^3$  que contém oito ensaios, divide-se a soma algébrica por quatro. Com exceção da coluna I (matriz identidade), que representará a média das respostas e, portanto, deve ser dividido pelo número exato de ensaios, no caso, oito (MONTGOMERY, 1976).

Por exemplo, para o efeito de interação entre o catalisador (2) e a concentração (3), precisamos da sétima coluna:

$$\begin{array}{c} \mathbf{23} \\ \left[ \begin{array}{c} +1 \\ +1 \\ -1 \\ -1 \\ -1 \\ -1 \\ +1 \\ +1 \end{array} \right] \end{array}$$

Aplicando esses sinais à coluna das respostas obtidas:

$$\left[ \begin{array}{c} y_1 \\ y_2 \\ y_3 \\ y_4 \\ y_5 \\ y_6 \\ y_7 \\ y_8 \end{array} \right] = \left[ \begin{array}{c} 54 \\ 86,5 \\ 48 \\ 63 \\ 63 \\ 93,5 \\ 58,5 \\ 72 \end{array} \right]$$

E fazendo o restante das operações, podemos escrever:

$$\mathbf{23} = \frac{+y_1 + y_2 - y_3 - y_4 - y_5 - y_6 + y_7 + y_8}{4} \quad \therefore$$

$$\mathbf{23} = \frac{54 + 86,5 - 48 - 63 - 63 - 93,5 + 58,5 + 72}{4} = 0,9\%$$

Calculando os demais efeitos, são encontrados os resultados da Tabela 2.10.

**Tabela 2.10** – Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2<sup>3</sup> da Tabela 2.9.

Média	67,3%
Efeitos principais:	
1 (Temperatura)	22,9%
2 (Catalisador)	-13,9%
3 (Concentração)	8,9%
Interação de dois fatores:	
12	-8,6%
13	-0,9%
23	0,9%
Interação de três fatores:	
123	0,1%

Algumas conclusões que podemos retirar da Tabela 2.10 são: I) Elevando a temperatura aumentamos o rendimento da reação; II) Esse efeito é muito mais pronunciado com o catalisador A do que com o catalisador B; e III) Quando a concentração é aumentada de 1,0 M para 1,5 M, ocorre um aumento médio de cerca de 9% no rendimento e não há evidência que de que esse aumento dependa dos níveis de outras variáveis, já que as interações 13, 23 e 123 são muito baixas.

Além de todas as informações possíveis que podemos retirar da análise dos efeitos de interação, serão exatamente esses efeitos de interação que possibilitarão a montagem do *modelo estatístico*. Este modelo é usado para descrever as respostas de um planejamento fatorial, formulado em termos dos efeitos por unidade de  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ . Para um planejamento 2<sup>3</sup>, a resposta observada no nível  $(x_1, x_2, x_3)$  é considerada como uma variável aleatória  $y(x_1, x_2, x_3)$  (MONTGOMERY, 1976), expressada da seguinte forma:

$$y(x_1, x_2, x_3) = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3$$

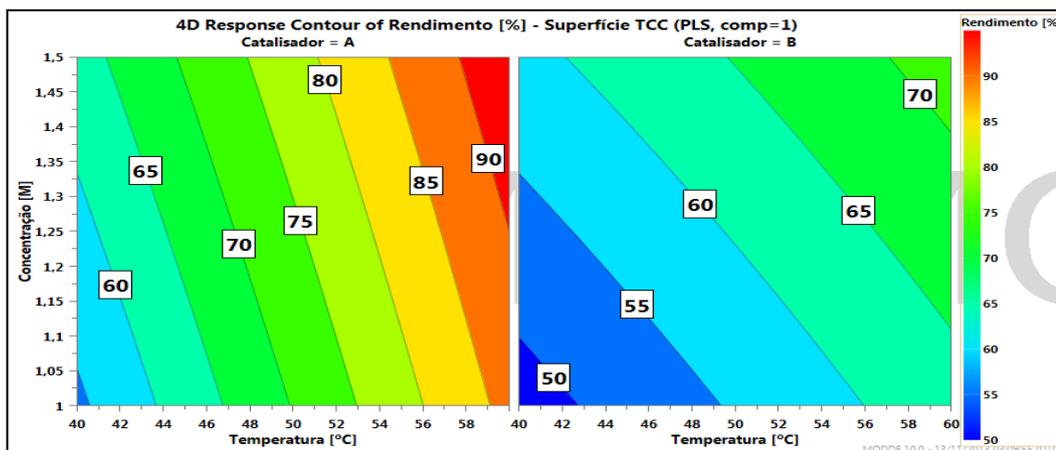
Onde  $b_0$  é o termo independente e corresponde a média das respostas do planejamento;  $b_1$ ,  $b_2$  e  $b_3$  são os valores populacionais dos três efeitos principais por unidade de  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ , que é a metade dos efeitos principais; e  $b_{12}$ ,  $b_{13}$ ,  $b_{23}$  e  $b_{123}$  são os valores populacionais dos efeitos de interação por unidade de  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ , que também é a metade dos valores dos efeitos de interação (MONTGOMERY, 1976). Como base na Tabela 2.10 é gerada então o modelo estatístico deste experimento:

$$y(x_1, x_2, x_3) = 67,3 + 11,4x_1 - 6,9x_2 + 4,4x_3 - 4,3x_1x_2 - 0,4x_1x_3 + 0,4x_2x_3 \\ + 0,1x_1x_2x_3$$

Vale ressaltar que para determinarmos os coeficientes exatos precisaríamos realizar um número infinito de experimentos, algo que não faz parte da metodologia do planejamento fatorial. O que foi calculado a partir dos resultados dos oito experimentos é apenas uma estimativa desses valores, também chamados de valores populacionais, ou estatisticamente falando, amostras (BRUNS, SCARMINIO e NETO, 2010).

Com o modelo estatístico, podemos estimar a resposta com base na variação dos fatores dentro de certo desvio padrão. É possível também estimar quais os níveis dos fatores que geram a maior resposta, caso seja de interesse aperfeiçoar o processo (LEARDI, 2009).

Programas computacionais de estatística como o Modde, da Umetrics, podem fornecer a chamada *superfície de resposta*. Com ela, o comportamento global do problema pode ser facilmente compreendido, e as condições correspondentes à máxima resposta, encontradas (Figura 2.20).



**Figura 2.20** – Superfícies de resposta de um exercício proposto por Bruns, Scarminio e Neto (2010) (Tabela 2.9). Rendimento em função da temperatura e concentração, fixando-se o catalisador A (esquerda) e B (direita).

Neste exemplo em específico, como o catalisador era um fator qualitativo (A ou B), não é possível atribuir valores para o modelo estatístico. Com base nesta particularidade, utilizou-se o Modde versão 10 para gerar duas superfícies de resposta à partir do modelo estatístico  $2^3$ , como se fossem dois planejamentos  $2^2$  distintos, um utilizando o catalisador A e, o outro, o B.

É importante lembrar que ao fazer os experimentos deve-se utilizar o método conhecido como *blocagem*, que consiste em neutralizar a influencia de todos os demais fatores que não são de nosso interesse (BRUNS, SCARMINIO e NETO, 2010). Isso envolve desde a padronização do procedimento de todos os experimentos até mesmo a utilização dos mesmos equipamentos e materiais, já que, como foi discutido no início deste capítulo, tudo é variável. Caso fossem utilizados reagentes de diferentes fornecedores ou lotes, no último exemplo, outros elementos como a variabilidade da produção de cada fornecedor também influenciaria sua resposta. Seus efeitos estariam confundidos entre os efeitos dos fatores principais e não seria possível distingui-los um do outro.

Contudo, apesar de o planejamento fatorial completo ser uma excelente ferramenta, na medida em que o número de variáveis envolvidas em um problema aumenta, o número de ensaios cresce drasticamente, o que pode tornar muitas vezes inviável sua utilização.

### 2.3.2 Quando as variáveis são muitas

O número de ensaios necessários para fazer um planejamento fatorial  $2^k$  completo aumenta rapidamente com  $k$ , o número de fatores investigados. Com sete fatores, por exemplo, um planejamento exigiria nada menos do que  $2^7 = 128$  ensaios. Nestes casos, a informação desejada muitas vezes pode ser obtida a partir de um número de ensaios bem menor, correspondente a uma fração do número de ensaios do planejamento completo. Isso é possível por dois motivos.

Primeiro, o número de interações de ordem<sup>10</sup> alta aumenta drasticamente com o número de fatores. Na maioria dos casos, essas interações têm valores pequenos e são destituídas de qualquer importância prática. Isto é, os efeitos principais (ou seja, de primeira ordem) tendem a serem maiores do que as interações de dois fatores (de segunda ordem), que por sua vez são mais importantes do que as interações de três fatores, e assim por diante. Essa tendência, naturalmente, se acentua para efeitos de ordem mais alta. Se esses efeitos não são significativos, determinar o seu valor não é motivo bastante para fazer todos os ensaios de um planejamento completo. Em segundo lugar, quando o número de fatores aumenta, crescem as chances de que um ou mais deles não afetem significativamente a resposta, seja por meio de efeitos principais, seja por meio de efeitos de interação (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Por outro lado, em muitas situações não conhecemos inicialmente a relação completa de todas as variáveis que afetam significativamente a resposta. Para não correr esse risco de excluir fatores que possam vir a ser relevantes, deve-se estudar, em um primeiro estágio, o maior número possível de variáveis. Podemos fazer isso sem aumentar o número de ensaios, utilizando o *planejamento fracionário*, em vez de fatoriais completos (BOX, HUNTER e HUNTER, 1978).

Um planejamento fracionário tem a notação  $2^{k-p}$ , onde  $p$  representa a fração não realizada do experimento completo. Um planejamento  $2^{4-1}$ , por exemplo, indica que temos quatro fatores, cada um com dois níveis, mas medimos apenas oito ensaios ( $2^3$ ). O expoente -1 mostra que o fatorial completo foi dividido por dois, também chamado de *fração meia* do fatorial completo

---

<sup>10</sup> A ordem é definida pelo número de fatores envolvidos nas interações.

(BRUNS, SCARMINIO e NETO, 2010). Caso tivesse sido dividido em quatro partes teria a notação  $2^{4-2}$ , e assim por diante.

Para construir frações meias, utiliza-se o efeito de interação de ordem mais alta para determinar os sinais da coluna de um dos fatores. Escreve-se a matriz de planejamento completo para  $k-1$  variáveis, então, atribuem-se à variável restante os sinais do produto entre os  $k-1$  fatores, ou então seus sinais exatamente contrários. Desta forma, é possível perceber que a última variável terá exatamente os mesmos sinais da interação de todos os demais fatores. E esta é a principal desvantagem dos planejamentos fracionários: as interações se confundem. Para cada ensaio que se deixa de fazer, diminui-se um grau de liberdade e, com ele, o número de grandezas passíveis de estimativas (BRUNS, SCARMINIO e NETO, 2010).

Então, quando um os efeitos tem os mesmos sinais das interações entre cinco fatores, o planejamento tem *resolução* cinco. Quando um deles tem os mesmos sinais das interações entre quatro fatores, resolução quatro, e assim por diante. Logo, quanto menor for a fração ensaiada do planejamento completo, menor será sua resolução e maior a perda de informação das interações entre fatores (BRUNS, SCARMINIO e NETO, 2010).

Portanto, apesar do planejamento fracionário reduzir o número de experimentos realizados, ele não permite a estimativa de todas as interações e, com isso, a possibilidade da modelagem de uma superfície de resposta e de sua otimização. O grande objetivo deste método é estimar os efeitos principais e identificar as variáveis mais relevantes para a realização de um planejamento completo (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

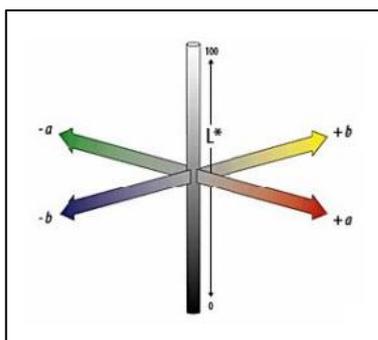
Segundo Rodrigues e Iemma (2005), a otimização de um processo com grande número de variáveis deve seguir a seguinte estratégia sequencial: I) Um ou mais planejamentos fracionários; II) Um ou mais planejamentos completos; III) Análise da superfície de resposta; e IV) Validação dos níveis dos fatores calculados como ótimos nas condições definidas.

### 3 METODOLOGIA PROPOSTA

Neste capítulo, será feita uma proposta sobre como seria uma metodologia para um estudo de formulação de um detergente enzimático empregando planejamento de experimentos. Serão discutidos como estes experimentos deveriam ser executados e como seriam as variáveis-resposta. Ter-se-á por base toda a bibliografia pesquisada realizada e o guia padrão de avaliação de desempenho na remoção de manchas em lavagens domésticas (ASTM D4265 – *Standard Guide for Evaluating Stain Removal Performance in Home Laundering*).

#### 3.1 Avaliação instrumental da eficiência de lavagem

A chave para a análise de desempenho é a utilização de um colorímetro fotoelétrico. O padrão de observação simulado pelo colorímetro fotoelétrico deve estar em função do sistema CIE-Lab, recomendado pela CIE (Comission Internationale de l'Éclairage) e amplamente usado atualmente. Neste sistema a variável “a” consiste no eixo das cores verde (-a) e vermelho (+a) e a variável “b” no eixo das cores azul (-b) e amarelo (+b). Os eixos “a” e “b” possuem ângulos retos e representam a dimensão da tonalidade ou cor. O terceiro eixo, chamado de “L”, é perpendicular ao plano “ab” e indica a luminosidade da amostra (Figura 3.1), cujo intervalo é o preto (0) e o branco (100). Com este sistema qualquer cor pode ser especificada com as coordenadas “L”, “a”, “b”.



**Figura 3.1** – Representação dos eixos do sistema tridimensional policromático.

A medição da efetividade da remoção das manchas consiste no cálculo do chamado Índice de Remoção de Sujeira, ou SRI, abreviação de *Stain Removal Index*. Cujá fórmula criada por Neiditch, Mills e Gladstone (1980) está representada na Equação 1.

$$SRI = 100 - [(L_c - L_w)^2 + (a_c - a_w)^2 + (b_c - b_w)^2]^{1/2} \quad \text{..... (1)}$$

Onde  $L$  é a reflectância,  $a$  é o índice da cor verde/vermelha,  $b$  é o índice da cor amarela/azul,  $c$  são os índices para o tecido sem sujeira (lavado sobre as mesmas condições de tratamento do tecido sujo – referência) e  $w$  são os índices para o tecido sujo.

Ao medir as reflectâncias, deve-se procurar ler as amostras com a mesma orientação para todas elas, por exemplo, o maior lado do retângulo de tecido (cortado durante a preparação das amostras) sempre perpendicular ao operador. Utilizar também filtros de luz ultravioleta para eliminar a interferência destes comprimentos de onda.

Calcular o SRI médio e o desvio-padrão das réplicas de cada amostra de cada tipo de tecido em cada ensaio. Pode-se também fazer a análise estatística da variância, estabelecendo diferenças significativas entre os tratamentos de cada ensaio e a influencia dos tipos de tecidos.

### **3.2 Seleção e preparação das amostras de tecidos**

Os experimentos podem envolver mais de um tipo de tecido, com os resultados tabulados separadamente. Os tecidos utilizados podem ser blendas de poliéster/algodão, 100% algodão, 100% poliéster ou nylon. Para este experimento

é aconselhável a utilização dos tecidos de algodão puro ou blends de poliéster/algodão.

Cortar os tecidos em pedaços de 100 a 200 cm<sup>2</sup>, de preferência em formato de retângulo para auxiliar na etapa final de análise instrumental do desempenho da lavagem.

Todas as amostras de tecido devem ser lavadas antes da aplicação da mistura contendo os agentes de sujeira selecionados. Isto é feito para eliminar resíduos de acabamento que podem influenciar os resultados, e também para simular as condições do tecido no ambiente doméstico. A pré-lavagem consiste de dois ciclos de lavagem à cerca de 60°C. O primeiro ciclo deve conter o detergente e 240mL de hipoclorito de sódio (NaClO), enquanto o segundo ciclo deve conter somente a água de lavagem e 60g de um agente complexante a base de fosfato, como o tripolifosfato de sódio (TPF – Na<sub>5</sub>P<sub>3</sub>O<sub>10</sub>). Secar os tecidos em uma secadora durante 40 minutos entre 60 e 70°C após o segundo ciclo. A concentração do detergente, bem como o modelo da máquina de lavar, devem ser os mesmos dos ciclos de lavagem dos ensaios, especificados no procedimento padrão dos experimentos (3.6). Após secos, passe os tecidos com a ajuda de um ferro, se necessário, para obter uma superfície plana.

### **3.3 Seleção dos agentes de sujeira e sua aplicação nas amostras**

Como o espectro de tipos de materiais que podem potencialmente manchar as roupas domésticas é muito grande, não há uma lista definida e fixa de agentes que possam prever a ampla gama de resultados de remoção de manchas em todas as situações de uso doméstico. A interpretação dos resultados para conclusões a respeito do desempenho do detergente será relativa, isto é, o desempenho será comparativo, conforme todo o conjunto de condições previamente estabelecidas pelo experimento.

Dentre os materiais utilizados para manchas estão o chá, café, vinho, suco de frutas, mostarda, molho de tomate, molho de carne, xarope de chocolate, grama, sangue humano ou animal, tinta de caneta esferográfica, maquiagem, óleo de motor usado, barro e gorduras em geral. Para este experimento, uma mistura

de molho de tomate contendo amido, gorduras (como óleo de oliva, óleo de soja e sebo animal), sangue animal fresco (coletado de açougues) e maquiagem, é o suficiente para testar a eficiência de todas as enzimas e o poder detergente da formulação de uma forma geral.

Para a aplicação da mistura de sujeira é necessário manter os tecidos relativamente tensionados e suspensos na horizontal. Um copo pode ser utilizado para esta finalidade, mantendo a amostra fixada sobre o bocal com a ajuda de um elástico. Com o auxílio de uma pipeta ou espátula de metal, colocar a quantidade da mistura de sujeira suficiente para causar uma mancha de no mínimo cinco centímetros de diâmetro para a leitura do instrumento de reflectância após a lavagem. A quantidade aplicada irá variar conforme o tipo de tecido e a sua capacidade de absorção.

Esperar entre duas a três horas para secar as manchas. Quando estiverem totalmente secas, manter as amostras separadas individualmente em uma estufa escura a uma temperatura entre 18°C e 24°C por um dia inteiro, etapa esta chamada de “envelhecimento das manchas”. Por último, marcar as amostras com uma caneta resistente a solventes e a água, caso queira diferenciar o tipo de tecido ou identificar as suas replicatas com mais facilidade.

### **3.4 Procedimento padrão**

Desenhar o protocolo de teste para gerar ao menos três replicatas para cada tipo de amostra da variável individual sobre estudo (produto ou procedimento). Por exemplo, em um ciclo de lavagem usando quatro tipos de manchas aplicadas em amostras diferentes e três tipos de tecidos, deverá haver 54 amostras (6 manchas X 3 tipos de tecidos X 3 replicatas). Isso permite uma estimativa adequada da variabilidade dos resultados. Uma segunda e uma terceira corrida podem ser feitas, gerando seis (ou nove) valores para cada tipo de amostra suja. O número de replicatas (amostras por corridas ou o número de corridas) pode ser expandido de acordo com as necessidades do experimento e a finalidade de aumentar o nível de confiança na análise dos resultados entre tratamentos.

O número de amostras não manchadas a serem incluídas em cada teste para a utilização como referência na análise da reflectância deverá ser apropriada para cada experimento.

*Condições de ensaio fixas (blocagem):* todas as condições do experimento que não estejam sob estudo deveram ser fixadas dentro do intervalo da prática doméstica. Qualquer máquina de lavar é aceitável, desde que sua capacidade esteja entre 60 e 70 litros e a velocidade do agitador esteja entre 65 e 75 rpm. Os ensaios devem ser feitos na mesma máquina de lavar selecionada ou em outra máquina da mesma marca e modelo. O ciclo de lavagem deverá estar em sua velocidade regular, com duração de 12 minutos, enchendo o tanque com água o suficiente para submergir os tecidos. A temperatura da água deve estar entre 30-35°C.

Utilizar o detergente segundo as recomendações do rótulo de venda aos consumidores. Caso a formulação ainda esteja em desenvolvimento, é aceitável se basear nas quantidades dos demais detergentes disponíveis no mercado. O importante é manter a mesma concentração para todos os ensaios.

*Pré-tratamento amostral:* aplicar o detergente sobre as amostras e equalizar o tempo de contato para todas as manchas, com um mínimo de 1 minuto antes de o tecido ser introduzido na água de lavagem agitada. Utilizam-se cinco mililitros para detergentes líquidos ou o suficiente em pó com água para cobrir a mancha, formando uma pasta.

Encher a máquina com água e iniciar a agitação. Adicionar o detergente e depois as amostras. Após o ciclo, secá-las em secadora automática entre 65-70°C durante 40-50 minutos, ou então ao ar, suspensas fora da luz direta do sol. Amostras enrugadas devem ser manualmente alisadas; evitar pressionar as amostras com ferro. Analisar as amostras somente 24h depois da retirada da secadora, armazenando às em um local escuro até o início da avaliação.

### **3.5 O Planejamento**

Antes de iniciar o planejamento dos experimentos, além de conhecer os fatores que afetam a resposta é preciso saber quais os níveis (intervalos) de cada

um desses fatores. Na Tabela 3.1 estão listados os componentes de um detergente enzimático e as suas proporções, baseado nos trabalhos de Martín e Martínez (2013) e Olsen e Falholt (1998).

**Tabela 3.1** – Formulação de um detergente.

<b>Matéria Prima</b>	<b>Formulação (m/m%)</b>
<i>Builders</i>	30,0 – 60,0
Surfactante	10,0 – 25,0
Alvejante	10,0 – 20,0
Ativadores (alvejante)	3,0 – 8,0
Alvejantes ópticos	0,1 – 0,3
Polímeros	2,5 – 5,0
Proteases	0,4 – 2,0
Amilases	0,4 – 1
Lipases	0,2 – 1
Celulases	1,0 – 3,0
Água	Até 100%

São infinitas as possibilidades da utilização do planejamento de experimentos para a resolução de problemas de diversas áreas. Para aplicações na indústria de detergentes, especificamente, foram encontrados somente os trabalhos de Alameda, Rodríguez, *et al.* (2010); Jurado, Bravo, *et al.* (2007); Kamoun, Chaabouni, *et al.* (2002); Baati, Kamoun, *et al.* (2005); e Martín e Martínez (2012). Contudo, nesta metodologia, serão apresentados outros dois problemas não abordados em nenhum dos trabalhos encontrados.

### 3.5.1 Formulação enzimática a partir de um detergente comum

Suponha-se que em uma determinada empresa seja necessário aprimorar a formulação de um detergente comum, adicionando enzimas. Deseja-se a obtenção do maior SRI possível. Os fatores que impactam nessa resposta são todos os ingredientes da formulação original e, agora, as enzimas – lipase, amilase, protease e celulase. Caso seja utilizado o mesmo lote da formulação original para todos os ensaios não é preciso considerá-lo como uma variável, já

que este permanecerá fixo. Dessa forma, utilizando os níveis encontrados na literatura, pode-se fazer um planejamento  $2^4$  conforme a Tabela 3.2. Adicionandose a quantidade necessária de enzimas em relação à porcentagem mássica da formulação total original.

**Tabela 3.2** – Sugestão de um planejamento  $2^4$  completo para a formulação enzimática em um detergente comum.

Fatores	(%)	(-)	(+)
1:	Protease (%)	0,4	2,0
2:	Amilase (%)	0,4	1,0
3:	Lipase (%)	0,2	1,0
4:	Celulase (%)	1,0	3,0

Ensaio	Protease	Amilase	Lipase	Celulase
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+

Após a realização dos ensaios – através do procedimento padrão descrito no tópico 3.6 – com suas replicatas e o cálculo da média e desvio padrão da resposta (SRI) para cada um deles, calcula-se os efeitos principais e as interações entre os fatores, manualmente através da matriz de contraste ou com o auxílio de *softwares* de álgebra linear e estatística.

Com esses cálculos é possível montar o modelo empírico, que para um planejamento  $2^4$  é escrito da seguinte maneira:

$$\begin{aligned}
 y(x_1, x_2, x_3) = & b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_2x_3 \\
 & + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{34}x_3x_4 + b_{123}x_1x_2x_3 + b_{234}x_2x_3x_4 \\
 & + b_{134}x_1x_3x_4 + b_{124}x_1x_2x_4 + b_{1234}x_1x_2x_3x_4
 \end{aligned}$$

Com este modelo, agora, é possível gerar a superfície de resposta do problema com o auxílio de programas computacionais. Recomenda-se o uso do *software* Modde versão 10.0, da Umetrics. Analisa-se então a superfície de modo a encontrar as concentrações das enzimas que originam a resposta máxima e, finalmente, se valida a formulação nas condições definidas.

Agora, suponha-se que o problema seja mais amplo. Neste novo caso, uma empresa do setor de limpeza gostaria de criar a sua primeira linha de detergente doméstico para roupas sem qualquer referência anterior.

### 3.5.2 Formulação de um detergente completo

Supõe-se que neste problema não há informação alguma sobre de que forma cada componente atua na eficiência. Se levamos em consideração absolutamente todos os componentes – *builder*, surfactantes aniônicos, catiônicos e não iônicos; alvejante; ativadores; branqueadores ópticos; polímeros de redeposição, de liberação de sujeira e inibidores de transferência de corantes; proteases; amilases; lipases; e celulases – teremos o equivalente a 14 fatores. Um planejamento fatorial completo levaria a mais de 16 mil ensaios, algo definitivamente impossível de ser feito.

Complexos problemas exigem uma metodologia diferenciada. Ela consiste em uma fase inicial denominada *screening*, onde se utiliza o planejamento fracionário de experimentos. As mais recentes versões de programas computacionais em estatística fornecem recomendações de planejamentos fatoriais para essa fase inicial em função do número de variáveis. Para 15 variáveis o *software* Modde indica um planejamento fatorial do tipo  $2_{IV}^{14-9}$  de resolução IV (Figura 3.2).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	LAS	QAC	AEO	Sequestrante	Alvejante	Ativadores	Ópticos	Pol1	Pol2	Pol3	Protease	Amilase	Lipase	Celulase	SRI
2	1	N1	5	Incl	6	2	2	30	10	3	0,1	0,75	0,75	0,75	0,4	0,4	0,2	1	
3	2	N2	14	Incl	15	2	2	30	10	8	0,1	0,75	1,5	1,5	0,4	1	1	3	
4	3	N3	24	Incl	6	5	2	30	10	8	0,3	0,75	0,75	0,75	2	1	1	1	
5	4	N4	11	Incl	15	5	2	30	10	3	0,3	0,75	1,5	1,5	2	0,4	0,2	3	
6	5	N5	13	Incl	6	2	5	30	10	8	0,3	1,5	1,5	0,75	0,4	0,4	0,2	3	
7	6	N6	28	Incl	15	2	5	30	10	3	0,3	1,5	0,75	1,5	0,4	1	1	1	
8	7	N7	7	Incl	6	5	5	30	10	3	0,1	1,5	1,5	0,75	2	1	1	3	
9	8	N8	8	Incl	15	5	5	30	10	8	0,1	1,5	0,75	1,5	2	0,4	0,2	1	
10	9	N9	19	Incl	6	2	2	40	10	3	0,3	1,5	1,5	1,5	2	1	0,2	1	
11	10	N10	10	Incl	15	2	2	40	10	8	0,3	1,5	0,75	0,75	2	0,4	1	3	
12	11	N11	17	Incl	6	5	2	40	10	8	0,1	1,5	1,5	1,5	0,4	0,4	1	1	
13	12	N12	12	Incl	15	5	2	40	10	3	0,1	1,5	0,75	0,75	0,4	1	0,2	3	
14	13	N13	6	Incl	6	2	5	40	10	8	0,1	0,75	0,75	1,5	2	1	0,2	3	
15	14	N14	25	Incl	15	2	5	40	10	3	0,1	0,75	1,5	0,75	2	0,4	1	1	
16	15	N15	34	Incl	6	5	5	40	10	3	0,3	0,75	0,75	1,5	0,4	0,4	1	3	
17	16	N16	16	Incl	15	5	5	40	10	8	0,3	0,75	1,5	0,75	0,4	1	0,2	1	
18	17	N17	32	Incl	6	2	2	30	15	3	0,1	1,5	0,75	1,5	2	0,4	1	3	
19	18	N18	35	Incl	15	2	2	30	15	8	0,1	1,5	1,5	0,75	2	1	0,2	1	
20	19	N19	30	Incl	6	5	2	30	15	8	0,3	1,5	0,75	1,5	0,4	1	0,2	3	
21	20	N20	29	Incl	15	5	2	30	15	3	0,3	1,5	1,5	0,75	0,4	0,4	1	1	
22	21	N21	20	Incl	6	2	5	30	15	8	0,3	0,75	1,5	1,5	2	0,4	1	1	
23	22	N22	26	Incl	15	2	5	30	15	3	0,3	0,75	0,75	0,75	2	1	0,2	3	
24	23	N23	23	Incl	6	5	5	30	15	3	0,1	0,75	1,5	1,5	0,4	1	0,2	1	
25	24	N24	15	Incl	15	5	5	30	15	8	0,1	0,75	0,75	0,75	0,4	0,4	1	3	
26	25	N25	21	Incl	6	2	2	40	15	3	0,3	0,75	1,5	0,75	0,4	1	1	3	
27	26	N26	3	Incl	15	2	2	40	15	8	0,3	0,75	0,75	1,5	0,4	0,4	0,2	1	
28	27	N27	33	Incl	6	5	2	40	15	8	0,1	0,75	1,5	0,75	2	0,4	0,2	3	
29	28	N28	1	Incl	15	5	2	40	15	3	0,1	0,75	0,75	1,5	2	1	1	1	
30	29	N29	27	Incl	6	2	5	40	15	8	0,1	1,5	0,75	0,75	0,4	1	1	1	
31	30	N30	9	Incl	15	2	5	40	15	3	0,1	1,5	1,5	1,5	0,4	0,4	0,2	3	
32	31	N31	4	Incl	6	5	5	40	15	3	0,3	1,5	0,75	0,75	2	0,4	0,2	1	

**Figura 3.2** – Planejamento fatorial  $2_{IV}^{14-9}$  para a etapa de *screening* de uma formulação completa de detergente.

*Componentes e intervalos escolhidos:* conforme encontrado durante a revisão bibliográfica, a dureza da água brasileira varia entre branda e pouco dura. Com base nesta informação, foi escolhido como surfactantes o alquilbenzeno linear sulfonado (LAS), o quaternário de amônio (QAC) e o álcool graxo polietileno glicol (AEO), em uma proporção de 3:1:1, respectivamente. Para sequestrantes de dureza, o carbonato de sódio (barrilha) por ser amplamente utilizado para esta finalidade. Selecionou-se ainda o percarbonato de sódio, como alvejante, o TAED como ativador, o Tinopal® para branqueamento óptico. Já para os polímeros, como não foi encontrada nenhuma concentração na literatura de cada um separadamente, dividiu-se em concentrações idênticas para a carboximetilcelulose (CMC), o copolímero entre politereftalato de etileno (PET) e

polietilenoglicol (PEG), e a polivinilpirrolidona (PVP). Os intervalos estão especificados na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3** – Níveis selecionados para cada componente com base na composição da Tabela 3.1.

Fatores (%)	(-)	(+)
1:	LAS	6,0 15,0
2:	QAC	2,0 5,0
3:	AEO	2,0 5,0
4:	Barrilha	30,0 40,0
5:	Percarbonato	10,0 15,0
6:	TAED	3,0 8,0
7:	Tinopal®	0,1 0,3
8:	CMC	0,75 1,5
9:	PET/PEG	0,75 1,5
10:	PVP	0,75 1,5
11:	Protease	0,4 2,0
12:	Amilase	0,4 1,0
13:	Lipase	0,2 1,0
14:	Celulase	1,0 3,0

Após a realização dos 32 experimentos, calculam-se os efeitos principais dos 14 fatores. Com a análise desses dados podemos fazer uma triagem de variáveis, excluindo os fatores da formulação cujos efeitos principais sejam ínfimos quando comparados aos efeitos dos demais. Caso haja efeitos principais pequenos, mas que quando somados à sua categoria (surfactantes, polímeros, alvejantes ou enzimas) se tornam relevantes, pode-se unificar esses fatores em um único fator, o de sua própria categoria, mantendo as mesmas proporções e os mesmos fatores caso todos eles sejam relevantes após a triagem. Dessa forma, após a exclusão e a unificação de alguns dos 14 fatores, é possível reduzir o número de experimentos para a realização de um planejamento fatorial completo. Assim, na melhor das hipóteses haveria somente os fatores: surfactante, *builder*, polímeros, alvejantes e enzimas. Cinco fatores resultam em um planejamento fatorial completo contendo somente 32 ensaios.

Caso algum dos fatores tenha um efeito principal muito relevante em relação aos demais de sua categoria após o planejamento fracionário, podemos deixá-lo separado de sua categoria. Suponha-se que dentre os três tipos de surfactantes utilizados, o LAS tenha um efeito principal realmente relevante em

comparação com os demais surfactantes. Entretanto, os outros dois não possuem um efeito principal tão baixo ao ponto de serem retirados da formulação. Uma alternativa é manter um fator “LAS” e outro fator “surfactante”, sendo este último a união do surfactante não iônico e catiônico. Desta forma, na melhor das hipóteses teríamos os seguintes fatores: LAS, surfactante, *builder*, polímeros, alvejantes e enzimas. Isto é, seis fatores que resultariam em um planejamento fatorial completo contendo 64 ensaios. Parece muito, porém é um número extremamente baixo se comparado aos 16 mil ensaios deparados no início do problema.

Resumindo, os próximos passos vão depender da análise das interações do planejamento fatorial. Cabe ao pesquisador ou estudante que faça estes experimentos decidir de que forma fará o planejamento fatorial completo, ponderando entre a exatidão na otimização e tempo/custo disponível.

É possível ainda ir além e dividir as performances entre três tipos de detergentes. Por exemplo, aquelas formulações cujo SRI for maior que 95%, poderiam ser enquadradas na categoria de alta qualidade, enquanto aquelas que obtiverem 80% ou mais na categoria média e, acima de 70%, baixa qualidade. Além disso, pode-se adicionar mais uma coluna à direita do SRI e calcular os custos de cada formulação ensaiada, selecionando assim as formulações de melhor custo-benefício para cada categoria ao dividir a eficiência pelo custo. Desta forma, admitindo que as formulações de alta qualidade provavelmente sejam mais caras que as demais, em uma mesma matriz de experimento cria-se uma linha completa de detergentes com diferentes preços para diferentes classes socioeconômicas.

## 4 CONCLUSÃO

Em 2005, um artigo publicado no Wall Street Journal pela empresa Procter & Gamble apresentou pela primeira vez os chamados “*Moments of Truth*” ou, em português, “Momentos da verdade”. O “primeiro momento da verdade” ocorre quando o consumidor está no ponto de venda como, por exemplo, em frente à gôndola do mercado, e decide escolher o produto de uma determinada empresa ao invés de outra. Pesquisas feitas pela empresa mostraram que o tempo do primeiro momento da verdade dura entre 3 a 7 segundos, isto é, este é o tempo em que o consumidor leva a decidir qual marca levar para casa. O “segundo momento da verdade” dá-se quando o consumidor, ao chegar à sua casa, experimenta o produto e avalia se as suas expectativas foram atingidas, definindo de forma subjetiva se o produto é bom ou não, para então decidir se comprará novamente.

Enquanto o “primeiro momento da verdade” é influenciado pelos estudiosos de marketing, que selecionam a melhor forma de comunicação para despertar o desejo do consumidor de acordo com uma estratégia adotada pela empresa, definitivamente o “segundo momento da verdade” é influenciado pelos estudiosos das ciências exatas, em particular, de pesquisadores e engenheiros. Cabe aos estudiosos dessa área definir e desenvolver o produto ou serviço para conquistar o maior número de “momentos da verdade” positivos, obtendo assim o crescimento da empresa e mantendo a sua credibilidade no mercado.

Algo que todos os estudantes de engenharia e outras ciências exatas aprendem durante a graduação é que tudo ao nosso redor é variável, nada é exato. Mas utilizando o conhecimento teórico do problema alinhado com a ferramenta correta é possível chegar muito próximo desta exatidão.

Após a revisão bibliográfica, observou-se a grande quantidade de componentes existentes de um detergente e as tecnologias envolvidas em um produto que está diretamente ligado ao dia-a-dia de todas as pessoas. Deste modo, conclui-se que as técnicas do planejamento de experimentos e o uso de *softwares* estatísticos são excelentes para a resolução de problemas não somente do âmbito acadêmico, como também em indústrias de bens de consumo.

## REFERÊNCIAS<sup>11</sup>

ALAMEDA, E. J. et al. Design of Experiments to Evaluate the Detergency of Surfactants on Fatty Soils in a Continuous-Flow Device. **Journal of Surfactants and Detergents**, Granada, 26 Fevereiro 2009. 191-199.

AMARAL, D. DOE (Design of Experiments). **Núcleo de Manufatura Avançada**, 1999. Disponível em: <[http://www.numa.org.br/conhecimentos/conhecimentos\\_port/pag\\_conhec/DOE.html](http://www.numa.org.br/conhecimentos/conhecimentos_port/pag_conhec/DOE.html)>. Acesso em: 08 nov. 2013.

BAATI, R. et al. Screening and optimization of the factors of a detergent admixture preparation. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Tunisia, v. 80, p. 6, Setembro 2005.

BIERMANN, M. et al. **Surfactants in Consumer Products**. Berlim: Spring-Verlag, 1987.

BORGES, F. R. Peroxy-Blend® uma alternativa para sistemas oxidantes em meio alcalino. **Revista Household & Cosméticos**, 2012. Disponível em: <[http://www.freedom.inf.br/artigos\\_tecnicos/03052006/peroxy\\_blend.asp](http://www.freedom.inf.br/artigos_tecnicos/03052006/peroxy_blend.asp)>. Acesso em: 13 out. 2013.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for Experimenters: An introduction to design, data analysis, and model building**. New York: Wiley, 1978.

BRITO, C. Dureza da água e problemas de lavagem. **Universidade de Lisboa**, 2012. Disponível em: <[http://moodle.fct.unl.pt/pluginfile.php/./Q11\\_AI26\\_Dureza\\_das\\_aguas.pdf](http://moodle.fct.unl.pt/pluginfile.php/./Q11_AI26_Dureza_das_aguas.pdf)>. Acesso em: 2013 Setembro 20.

BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; NETO, B. D. B. **Como Fazer Experimentos**. 4ª edição. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

BURGESS, J. et al. **Advances in Inorganic Chemistry: Homogeneous Catalysis**. 1ª Edição. ed. Oxford: Academic Press, 2013.

CAHN, A. **Proceedings of the 3rd World Conference on Detergents: Global Perspectives**. 1ª Edição. ed. [S.I.]: AOCS Publishing, 1994.

---

<sup>11</sup> De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

CALVIMONTES, A.; LANT, N. J.; DUTSCHK, V. Cleanability Improvement of Cotton Fabrics Through Their Topographical Changes Due to the Conditioning with Cellulase Enzyme. **Journal of Surfactants and Detergents**, Berlin, 20 Agosto 2011. 131-137.

COUTINHO, R. L. M. Artigos de Marketing. **Administradores**, 2013. Disponível em: <<http://www.administradores.com.br/artigos/marketing/o-primeiro-momento-de-verdade-mudou/72083/>>. Acesso em: 08 nov. 2013.

DE CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, 2010.

DE CASTRO, H. F. Escola de Engenharia de Lorena. **Sabões e Detergentes**, 2009. Disponível em: <<http://sistemas.eel.usp.br/docentes/arquivos/5840556/434/sabaoedetergentes.pdf>>. Acesso em: 29 out. 2013.

EDITORA INSUMOS. **Site da Editora Insumos**, 2010. Disponível em: <[http://www.insumos.com.br/funcionais\\_e\\_nutraceuticos/materias/86.pdf](http://www.insumos.com.br/funcionais_e_nutraceuticos/materias/86.pdf)>. Acesso em: 2013 nov. 05.

ESSENTIAL Industries. **Essential Industries, Inc.**, 2013. Disponível em: <<http://www.essind.com/Cleaners/GC-chemistry.htm#Soil>>. Acesso em: 25 Setembro 2013.

GAMARRA, N. N.; VILLENA, G. K.; GUTIERREZ-CORREA, M. Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations. **BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS AND PROCESS ENGINEERING**, Lima, 31 Março 2010. 545-551.

HENDRICKS, M. H. Measurement of Enzyme Laundry Product Dust Levels and Characteristics in Consumer Use. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, Ohio, Junho 1970. 207-211.

JURADO, E. et al. Hard-Surface Cleaning Using Lipases: Enzyme–Surfactant Interactions and Washing Tests. **Journal of Surfactants and Detergents**, Granada, 16 Janeiro 2007. 61-70.

KAMOUN, A. et al. Mixture design applied to the formulation of hydrotropes for liquid detergents. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Tunisia, v. 63, p. 69-79, 28 Agosto 2002.

LEARDI, R. Experimental design in chemistry: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, Genova, 10 Junho 2009. 161-172.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia Industrial**. [S.l.]: Edgard Blücher LTDA, v. III, 2002.

MAGELA, C. Ficha de informações de segurança de produtos químicos, 31 out. 2012. Disponível em:  
<<http://www.quirios.com.br/Produto/PDF/METABORATO%20DE%20SODIO.pdf>>.  
Acesso em: 13 out. 2013.

MARTÍN, M.; MARTÍNEZ, A. 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**, Strombeek-Bever, v. 91, p. 795-809, 8 Agosto 2012.

MARTINS, M. B. D. O. **Avaliação do potencial de formação de AOX na indústria de detergentes**. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa. 2009.

MENDELSON, C. **Laundry: The Home Comforts Book of Caring for Clothes and Linens**. 1ª Edição Reimpressa. ed. [S.l.]: Scribner, 2010.

MERCADE, M. E.; MANRESA, M. A. The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. **Journal of America Oil Chemists Society**, 1994.

MERHEB, C. W. et al. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**, 2007. 127-131.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 1ª edição. ed. Nova Iorque: Wiley, 1976.

MORRISON, R.; BOYD, R. **Química Orgânica**. 13ª Edição. ed. [S.l.]: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996.

MURATA, M. et al. New Detergent Mechanism with Use of Novel Alkaline Cellulase. **Journal of Surfactants and Detergents**, Tochigi, Julho 1991. 553-558.

NEIDITCH, O. W.; MILLS, K. L.; GLADSTONE, G. The Stain Removal Index (SRI): A New Reflectometer Method for Measuring and Reporting Stain Removal Effectiveness. **Journal Of The American Oil Chemists Society** , Dezembro 1980. 426-429.

OBENDORF, S. K. et al. Function of Lipase in Lipid Soil Removal as Studied Using Fabrics with Different Chemical Accessibility. **Journal of Surfactants and Detergents**, Ithaca, Julho 2001. 233-245.

O'LENICK, A. J. Soil Release Polymers. **Journal of Surfactants and Detergents**, Dacula, Outubro 1999.

OLSEN, H. S.; FALHOLT, P. The Role of Enzymes in Modern Detergency. **Journal of Surfactants and Detergents**, Denmark, Outubro 1998.

ORGANIC Chemistry Portal. **Organic Chemistry**, 2006. Disponível em: <<http://www.organic-chemistry.org/>>. Acesso em: 13 out. 2013.

POLYORGANIC TECNOLOGIA LTDA. Sobre a empresa: Polyorganic. **Site da Polyorganic Tecnologia Ltda**, 2012. Disponível em: <<http://www.polyorganic.com.br/>>. Acesso em: 13 Outubro 2013.

RAWLINGS, N. **The Handbook of Proteolytic Enzymes**. 3ª Edição. ed. Cambridge: Academic Press, 2013.

ROCHA, J. M. S. Aplicações de agentes tensoactivos em biotecnologia. **Boletim de biotecnologia**, Lisboa, Dezembro 2009.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

SCIENCE in the Box. **Procter & Gamble Co.**, 2013. Disponível em: <<http://www.scienceinthebox.com/>>. Acesso em: 1 out. 2013.

UNILEVER. História completa de OMO, 2012. Disponível em: <[http://www.unilever.com.br/Images/Omo\\_tcm95-106348.pdf](http://www.unilever.com.br/Images/Omo_tcm95-106348.pdf)>. Acesso em: 23 out. 2013.

UNIVERSIDADE Federal de Santa Catarina. **Departamento de Engenharia Química e de Engenharia de Alimentos**, 2010. Disponível em: <[http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc\\_eng\\_bioq/trabalhos\\_grad2005\\_2/detergentes/detergentes.htm](http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_grad2005_2/detergentes/detergentes.htm)>. Acesso em: 23 out. 2013.

UNIVERSIDADE Federal de Uberlândia. **Projetos de Graduação em Engenharia Química**, 2013. Disponível em: <[ftp://ftp.feq.ufu.br/Curso\\_Eng\\_Quimica/Monografias%20-%20Projetos%20de%20Gradua%E7%E3o/2008/Vin%EDcius%20Domingos%20de%20Oliveira%20-%20Processos%20para%20fabrica%E7%E3o%20de%20shampoos,%20detergentes,%20limpa-vidros,%20cosm%E9ticos,%20desodorantes%20e%20](ftp://ftp.feq.ufu.br/Curso_Eng_Quimica/Monografias%20-%20Projetos%20de%20Gradua%E7%E3o/2008/Vin%EDcius%20Domingos%20de%20Oliveira%20-%20Processos%20para%20fabrica%E7%E3o%20de%20shampoos,%20detergentes,%20limpa-vidros,%20cosm%E9ticos,%20desodorantes%20e%20)>. Acesso em: 23 out. 2013.

YANGXIN, Y.; JIN, Z.; BAYLY, A. E. Development of Surfactants and Builders in Detergent Formulations. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, Agosto 2008. 517-527.

ZINI, P. Polymeric Antiprecipitant Systems for Household and Industrial Detergents. In: BALDWIN, A. R. **Second World Conference on Detergents: Looking Towards the 90's** : Proceedings. [S.l.]: The American Oil Chemists Society, 1987.

ZOBY, J. L. G.; OLIVEIRA, F. R. Agência Nacional de Águas. **Ministério do Meio Ambiente**, Maio 2005. Disponível em: <[http://arquivos.ana.gov.br/planejamento/planos/pnrh/VF%20Qualidade%20Aguas Subterraneas.pdf](http://arquivos.ana.gov.br/planejamento/planos/pnrh/VF%20Qualidade%20Aguas%20Subterraneas.pdf)>. Acesso em: 28 out. 2013.