

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**APLICAÇÃO DE ENZIMAS NO
PROCESSAMENTO DE COUROS:
COMPARAÇÃO ENTRE PROCESSOS
QUÍMICOS E COENZIMÁTICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Franck da Rosa de Souza

Porto Alegre

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**APLICAÇÃO DE ENZIMAS NO
PROCESSAMENTO DE COUROS:
COMPARAÇÃO ENTRE PROCESSOS
QUÍMICOS E COENZIMÁTICOS**

Franck da Rosa de Souza

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador:

Prof.^a Dra. Mariliz Gutterres

Porto Alegre

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação *Aplicação De Enzimas No Processamento De Couros: Comparação Entre Processos Químicos E Coenzimáticos*, elaborada por Franck da Rosa de Souza, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química

Comissão Examinadora:

Dra. Míriam Cooper

Prof. Dr. Nilo Sérgio Medeiros Cardozo

Prof.^a Dra. Patrice Monteiro de Aquim

Agradecimentos

Ao CNPq (Edital MCT/CNPq/CT-Agronegócio 40/2008) e CAPES pelo apoio financeiro.

À professora Mariliz Gutterres, que me orientou neste trabalho, por todo incentivo, dedicação e amizade.

Ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, pela concessão da Bolsa.

Aos Bolsistas que trabalharam comigo para o desenvolvimento da etapa experimental, em especial a bolsista Maria Izabel.

Aos colegas de grupo de trabalho do LACOURO pelas contribuições ao longo deste trabalho.

Aos amigos do LACOP, pelos momentos de distração e descontração e a todos os ex-colegas de curso que se tornaram amigos.

Aos meus pais que sempre acreditaram no meu potencial, me incentivaram e torceram pelo meu sucesso.

À Gabi, por tornar mais fácil esta jornada, pelo apoio e carinho incondicional, pela compreensão nos momentos de ausência e pela presença em todos os momentos nestes últimos anos.

Resumo

A procura por tecnologias que minimizem o consumo de água e o potencial poluidor da indústria do couro tem aumentado. O uso de enzimas em diversas etapas produtivas deste processo é uma alternativa cada vez mais comum, pois além de ser considerada tecnologia limpa, acelera o processo produtivo. O objetivo deste trabalho foi analisar o desempenho de oito enzimas comerciais (A1, B1, B2, B3, C1, C2, C3 e C4) fornecidas por três empresas do setor (A, B e C) em processos chamados coenzimáticos, com teores reduzidos de produtos químicos, nas etapas de remolho, depilação/caleiro e purga, por meio da comparação com processos tradicionais puramente químicos. Na etapa de remolho foi verificada a influência do tempo de processamento, tipo e concentração de enzima, sendo a pele analisada quanto ao teor de gorduras e matéria volátil e o banho analisado com relação à concentração de cloretos, sólidos totais, fixos e voláteis. Na etapa de depilação/caleiro foi estudada a influência do tempo, tipo e concentração de enzima, em comparação com dois processos químicos (tradicional e reduzido), sendo analisada a pele em diferentes tempos de processo (via análise de MEV). Na etapa de purga, o processo foi avaliado com relação ao tipo de enzima aplicada e ao tempo de processamento. Ao todo foram realizados 24 testes (12 de remolho, 6 de depilação/caleiro e 6 de purga) e em todos eles, além das análises citadas anteriormente, foram feitas análises de Carbono Orgânico Total (COT) e Proteína Solúvel (método de Lowry) nos banhos. Adicionalmente, foi determinada a atividade das enzimas A1, B3 e C3 frente ao colágeno e das enzimas A1, B3, C3 e B1 frente a lipídeos. Em geral, os resultados apontam que os processos coenzimáticos alcançam um maior potencial de remoção de matéria orgânica, quando comparado

aos processos puramente químicos, destacando-se as enzimas C1 no remolho e B1 e B2 na depilação/caleiro. Na purga as enzimas apresentaram desempenho semelhante, destacando-se as enzimas B3 e C3. Os testes de determinação da atividade enzimática demonstraram que a enzima B3 não apresenta atividade frente ao colágeno, enquanto que as enzimas A1 e C3 possuem atividade frente a este substrato. Já para a atividade lipolítica, o maior desempenho foi verificado para a enzima A1. A utilização de enzimas em curtumes tem sua eficácia comprovada na etapa de purga, recentemente na depilação/caleiro e remolho também apresentou resultados positivos.

Palavras-chave: Processamento de couros, biotecnologia, enzima, processos coenzimáticos

Abstract

The search for technologies that minimize water consumption and pollution potential of the leather industry has increased. The use of enzymes in various productive stages of this process is a common alternative, since it is a clean technology and accelerates the process. The aim of this study was to analyze the performance of eight commercial enzyme (A1, B1, B2, B3, C1, C2, C3 and C4) provided by three companies in the sector (A, B and C) in processes appointed co-enzymatic, with reduced levels chemicals on the steps of soaking, dehairing/liming and bating, by comparison with the traditional purely chemical. In the stage of soaking was seen from the influence of processing time, type and enzyme's concentration, being the skin analyzed for fat content and volatile matter and bath analyzed with respect to the concentration of chloride, total solids, fixed and volatile. In step dehairing/liming was studied the influence of time, type and enzyme's concentration, compared with two chemical processes (traditional and reduced) and the skin was treated at different process times (by SEM analysis). In the bating step, the process was evaluated for the type of enzyme used and the processing time. Altogether 24 tests were performed (12 of soaking, 6 of dehairing/liming and 6 of bating) and all of them, besides the previously mentioned tests were analyzed for Total Organic Carbon (TOC) and Soluble Protein (Lowry method) in baths. Additionally, it was determined the activity of enzymes A1, B3 and C3 against the collagen and enzymes A1, B3, C3 and B1 front of lipids. In general, the results indicate that the co-enzymatic processes reach a greater potential for removal of organic matter when compared to purely chemical processes, especially the enzymes in the soaking C1, B1 and B2 in dehairing/liming. In bating, the enzymes showed similar performance, especially enzymes B3 and C3. Tests for determination of enzyme activity showed that the

enzyme has no activity against B3 to collagen, while the A1 and C3 enzymes have activity against this substrate. As for the lipase activity, the greatest effects were observed for the enzyme A1. The use of enzymes in leather processing has proven effective in purging step recently in soaking and dehairing/liming also had positive results.

Keywords: Leather processing, biotechnology, enzyme, co enzymatic process

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema de um corte de pele	8
Figura 2: Esquema das moléculas de triglicerídeos	10
Figura 3: Esquemática das estruturas presentes no pêlo	12
Figura 4: Estrutura de uma típica molécula de colágeno. (A) Modelo para uma única cadeia polipeptídica (B) Modelo representativo de parte do tropocolágeno.	14
Figura 5: Esquema da ação da enzima lisil oxidase sobre o colágeno.	16
Figura 6: Formação da aparência estriada das fibrilas. (A) visualização de uma banda escura. (B) Micrografia de uma fibrila de colágeno.....	17
Figura 7: Esquema de um aminoácido.	21
Figura 8: Representação esquemática de uma ligação peptídica	23
Figura 9: Esquema de funcionamento do mecanismo chave-fechadura	24
Figura 10: Gráfico da velocidade da reação versus concentração de substrato	29
Figura 11: Fluxograma de processamento do couro	33
Figura 12: Esquema de rompimento por redução das pontes dissulfídicas da cistina	39
Figura 13: Esquema de hidrólise da pontes de cistina.	39
Figura 14: Esquema de rompimento das pontes dissulfetos por agente oxidante. ...	40
Figura 15: Esquema da formação de sabões na etapa de depilação e caleiro.	42
Figura 16: Esquema de uma pele bovina. Principais regiões (esquerda) e divisão em meias peles (direita).....	50
Figura 17: Fotografia da pele bovina utilizada nos testes.....	50
Figura 18: Esquema de divisão da pele.....	51

Figura 19: Fotografia dos fulões de bancada utilizados na realização dos experimentos	55
Figura 20: Representação do esquema de aleatorização das amostras de pele para realização dos testes.	57
Figura 21: Uso de fenolftaleína na etapa de desencalagem.....	61
Figura 22: Fotografia do microscópio eletrônico de varredura utilizado.	65
Figura 23: Preparação de amostras para as análises de MEV. (a) amostra de pele desidratada; (b) amostra de pele metalizada.....	66
Figura 24: Equipamento de análises de Carbono Orgânico Total utilizado nos experimentos	66
Figura 25: Percentual de Matéria volátil nas peles para os testes de remolho.....	71
Figura 26: Concentração de cloretos em banho para os testes de remolho	72
Figura 27: Concentração de Sólidos totais (ST) em banho para os testes de remolho	73
Figura 28: Concentração de Sólidos fixos (SF) em banho para os testes de remolho	74
Figura 29: Concentração de Sólidos voláteis (SV) em banho para os testes de remolho	74
Figura 30: Perfis das análises de ST, SF e SV em banho para os testes de remolho	75
Figura 31: Percentual de substâncias extraíveis com diclorometano em peles para os testes de remolho.....	76
Figura 32: Curva padrão e equação da reta para os ensaios de proteína solúvel	77
Figura 33: Proteína solúvel para os banhos dos testes de remolho	78
Figura 34: Concentração de Carbono Orgânico Total para os banhos dos testes de remolho	79
Figura 35: Banhos residuais dos testes de depilação e caleiro ao final do processo	81
Figura 36: Da esquerda para a direita (testes 1, 2 e 3), peles ao final do processo de depilação e caleiro	82
Figura 37: Análise de proteína solúvel para os banhos dos testes de depilação e caleiro.	82
Figura 38: Análise teor de Carbono Orgânico Total para os banhos dos testes de depilação e caleiro.	83

Figura 39: Imagens das amostras de pele dos testes 1 a 6, da esquerda para direita, analisadas após 1 hora do início do processo de depilação e caleiro, obtidas em MEV	85
Figura 40: Imagens das amostras de pele dos testes 1 a 6, da esquerda para direita, analisadas após 1 hora e 45 minutos do início do processo de depilação e caleiro, obtidas em MEV.....	86
Figura 41: Imagens das amostras de pele dos testes 1 a 6, da esquerda para direita, analisadas após 2 horas e 45 minutos do início do processo de depilação e caleiro, obtidas em MEV.....	86
Figura 42: Imagens das amostras de pele dos testes 1 a 6, da esquerda para direita, analisadas após 4 horas e 15 minutos do início do processo de depilação e caleiro, obtidas em MEV.....	87
Figura 43: Imagens das amostras de pele dos testes 1 a 6, da esquerda para direita, analisadas após 16 horas e 15 minutos do início do processo de depilação e caleiro, obtidas em MEV.....	88
Figura 44: Imagem de uma pele ao final de um teste de caleiro coenzimático	88
Figura 45: Banhos de purga dos Teste 1 (30 minutos), à esquerda, e Teste 2 (3 horas), à direita	89
Figura 46: Concentração de proteína solúvel dos banhos dos testes de purga	90
Figura 47: Análise teor de Carbono Orgânico Total para os banhos dos testes de purga.....	91
Figura 48: Caracterização de atividade de collagenases para a enzima A1 em diferentes concentrações.....	93
Figura 49: Caracterização enzimática de collagenases para as enzimas C3	94
Figura 50: Caracterização enzimática de lipases para as enzimas B1.....	95
Figura 51: Caracterização enzimática de lipases para as enzimas B3.....	95
Figura 52: Caracterização enzimática de lipases para as enzimas C3	96
Figura 53: Caracterização enzimática de lipases para as enzimas A1.....	97

Lista de Tabelas

Tabela 1: Dados do setor pecuário (bovino) e coureiro	2
Tabela 2: Características especiais do colágeno	13
Tabela 3: Conteúdo de aminoácidos de relevância para o colágeno tipo I	15
Tabela 4: Elementos estruturais do colágeno.....	18
Tabela 5: Classificação dos aminoácidos padrões.....	22
Tabela 6: Classificação de enzima de acordo com o tipo de reação.....	25
Tabela 7: Relação dos produtos químicos empregados na fase de teste das formulações	52
Tabela 8: Relação das enzimas utilizadas no experimento	54
Tabela 9: Formulações utilizadas nos testes das etapas de remolho	58
Tabela 10: Formulações utilizadas na depilação/caleiro	60
Tabela 11: Formulação de desencalagem (para peles divididas).....	61
Tabela 12: Formulações utilizadas na purga	63
Tabela 13: Relação das análises realizadas após os testes	64
Tabela 14: Resultados obtidos para a caracterização da pele salgada antes do seu processamento	70
Tabela 15: Resultados médios e desvio padrão dos ensaios realizados para os testes de remolho	80
Tabela 16: Resultados médios e desvio padrão das análises feitas nos testes de remolho	80
Tabela 17: Resultados médios e desvio padrão dos ensaios realizados para os testes de depilação e caleiro.....	84
Tabela 18: Resultados médios e desvio padrão dos ensaios realizados para os testes de purga	92

Sumário

Introdução	1
1.1. Objetivos.....	5
1.2. Limitações do Trabalho de Pesquisa.....	5
1.2. Estrutura do trabalho	6
Revisão Bibliográfica	7
2.1. Pele	7
2.1.1. Estrutura da Pele.....	8
Epiderme	8
Derme	9
Hipoderme	10
2.1.2. Composição da pele (constituintes moleculares).....	10
Triacilgliceróis	10
Elastina	11
Queratinas	11
Colágeno	13
Matriz extracelular	20
2.2. Noções de Bioquímica.....	21
2.2.1. Aminoácidos.....	21
2.2.2. Proteínas	23
2.2.3. Enzimas.....	24
Nomenclatura e classificação	25
Mecanismo de catálise	25
Cinética da reação.....	26
A Equação de Michaelis-Menten	26
Fatores que influenciam a atividade enzimática.....	30

2.3.	Processamento de Peles.....	32
2.3.1.	Operações de Ribeira.....	35
	Remolho	35
	Depilação e caleiro	37
	Purga	44
2.4.	Uso de Enzimas em Curtumes	45
	Metodologia Experimental	49
3.1.	Pele	49
3.2.	Produtos Químicos	52
3.3.	Enzimas	53
3.4.	Procedimento Experimental.....	54
3.4.1.	Remolho	57
3.4.2.	Depilação/Caleiro	59
3.4.3.	Desencalagem.....	60
3.4.4.	Purga.....	62
3.5.	Métodos Analíticos	63
3.6.	Caracterização Enzimática	67
	Resultados e Discussão.....	69
4.1.	Caracterização da Pele Utilizada.....	69
4.2.	Testes de Remolho.....	70
4.3.	Testes de Depilação e Caleiro.....	81
4.3.1.	Análise de MEV	84
4.4.	Testes de Purga	89
4.5.	Caracterização Enzimática	92
	Conclusões.....	99
5.1.	Análise do Setor	101
5.2.	Sugestões Para Trabalhos Futuros	102
	Anexos	111

Introdução

A produção mundial de couros segue em ritmo de aumento nos últimos anos. Conforme Gupta (2000), a contribuição de países desenvolvidos na produção de couro declinou de 74% para 47%, enquanto que a produção nos países em desenvolvimento aumentou de 26% para 53%, nas últimas três décadas do século XX.

O compêndio estatístico mundial de 2010, lançado pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação, FAO (2010), apontou que, no ano de 2008, o rebanho de bovinos alcançou a marca de 1,57 bilhões de cabeças de gado, correspondendo a aproximadamente 6,1 milhões de toneladas de pele salgada. O comércio mundial de couros e artigos bovinos evoluiu de US\$ 4 bilhões na década de setenta para US\$ 58,2 bilhões em 2007 (FAO, 2010).

No Brasil, a indústria do couro tem um papel importante na economia. A Tabela 1, elaborada a partir de dados do relatório da FAO apresenta a evolução do setor entre a década de 90 e o ano de 2007, onde, segundo a FAO, o Brasil ocupa posição de destaque no setor coureiro, sendo considerado o quarto maior produtor e o terceiro exportador mundial de couros bovinos.

Segundo dados de 2008 do Centro das Indústrias de Curtumes do Brasil (CICB), o setor coureiro-calçadista movimentou um PIB estimado em US\$ 3,5 bilhões, contribuindo com cerca de 8% para o saldo da balança comercial brasileira;

dispõe de 800 empresas de produção e processamento de couro e gera em torno de 50 mil postos de trabalho, Silveira (2009). O Rio Grande do Sul, por sua vez, contribui com o maior número de estabelecimentos de curtimento (220 em 2008) gerando 15.821 empregos no Estado, conforme Santos (2010).

Tabela 1: Dados do setor pecuário (bovino) e coureiro

Década de 90	2007	Descrição
145 milhões	224 milhões	Rebanho de cabeças de gado
22,7 milhões	37,6 milhões	Quantidade peles salgadas
454,7 milhões ton	752 milhões ton	Pele salgada produzida
100 ton	6900 ton	Pele salgada exportada
US\$ 0,1 milhões	US\$ 2,7 milhões	Pele salgada comercializada
21 milhões ton	35 milhões ton	Couro heavy produzido
3800 ton	2700 ton	Couro heavy importado
2100 ton	18200 ton	Couro heavy exportado
US\$ 20,2 milhões	US\$ 214,5 milhões	Couro heavy comercializado

Fonte: FAO (2010)

Se por um lado, a indústria do couro utiliza como matéria-prima um subproduto da indústria da carne (que poderia resultar em ganho ambiental), por outro, o processo produtivo, que visa à transformação da pele em couro, necessita de um grande volume de água e agentes químicos, o que, somado ao mau cheiro e a grandes volumes de efluentes, acaba por tornar negativa a imagem desta indústria.

Os processos de ribeira e curtimento, de acordo com Ramirez *et al.* (2003), produzem cerca de 80% da poluição gerada pelos curtumes, destacando-se a geração de gases nocivos como sulfeto de hidrogênio, lodos contendo cal, enxofre e cromo, além do imenso volume de água que é utilizado.

Para Rao *et al.* (2003), a indústria do couro emprega cerca de 30.000 a 40.000 litros de água por tonelada de pele processada, gerando em torno de 250 kg de couro curtido. Transpondo-se estes números para uma escala mundial, o consumo de água passa a ser enorme. Segundo Rajamani *et al.* (2008), o processamento médio de couros no mundo é de 50.000 ton/dia e a descarga de efluente é superior a 150 milhões l/dia.

O efluente dos curtumes, segundo Passos (2007), é composto principalmente por matéria orgânica, proveniente da pele (sangue, proteínas removidas, esterco, pêlos dissolvido, gorduras emulsionadas); sais (provenientes dos processos de conservação da pele); cálcio (proveniente do caleiro) e cromo (oriundo das etapas de curtimento e recurtimento).

Os resíduos sólidos provenientes do processamento das peles e gerados como subprodutos em curtumes são de três tipos:

- Restos de peles retirados em etapas anteriores ao curtimento;
- Restos de peles curtidas (ou seja, de couro);
- Lodos provenientes dos sistemas depuradores de efluentes líquidos.

Segundo Pacheco (2005), para cada tonelada de pele a ser processada, são geradas as quantidades de resíduos mencionadas abaixo:

- **Resíduos de ribeira:** 120 kg na forma de recorte e de 70 a 230 kg de carnaças (muitas vezes a operação de pré-descarne é realizada nos abatedouros, o que pode causar a variabilidade mencionada);
- **Resíduos da etapa de curtimento:** 115 kg como recortes e aproximadamente 100 kg como farelo de rebaixamento;
- **Resíduos da etapa de acabamento:** 32 kg na forma de recortes e 2 kg na forma de pó.

Há ainda uma quantidade de materiais que são extraídos por meio de banhos de tratamento e que se concentram no lodo final do efluente tratado.

Entre os fatores poluidores é importante salientar o emprego de sais de cromo no processo de curtimento, gerando resíduos com a presença de cromo, que segundo a norma brasileira NBR-10004 da ABNT, são classificados como Resíduos Classe I - Perigosos, necessitando tratamento e disposição específica. O gerenciamento pela indústria deste tipo de resíduo tem gerado grandes problemas devido à dificuldade de se encontrar local adequado para disposição final.

As entidades e órgãos de regulamentações ambientais em todo mundo têm atuado no sentido de minimizar a poluição gerada pela atividade humana, principalmente nas indústrias. Isto torna os limites de emissão de efluentes cada vez mais restritivos, obrigando o setor industrial a buscar e implementar novas

tecnologias produtivas menos agressivas ao meio ambiente, tratamentos de efluentes e resíduos mais eficientes e produtos biodegradáveis, ou que possam ser reciclados após sua vida útil. No Rio Grande do Sul, por exemplo, a legislação ambiental é a mais restritiva do país, com relação aos limites de emissão de efluentes.

Contudo, mudanças estão sendo introduzidas no setor coureiro objetivando a minimização do impacto desta atividade no meio ambiente. Foram desenvolvidos trabalhos específicos para os curtumes nas áreas de reciclo de banhos, Passos (2007); otimização da dosagem de produtos químicos, Aquim (2004); recuperação do cromo contido no lodo e nos resíduos da operação de rebaixamento por Kupec *et al.* (2002), Pereira (2006), Amaral *et al.* (2008), Dettmer (2008), Kanagaraj *et al.* (2008) e Silva (2008); utilização de enzimas, por Crispim e Mota (2003), Choudhary *et al.* (2004), Anandan *et al.* (2008), Bhavan *et al.* (2008), Rajput (2009) e Gutterres *et al.* (2009).

O uso da biotecnologia pela indústria (ou “*White Biotechnology*”, como se popularizou) tem sido citado como uma promissora alternativa no combate à poluição, indo em direção ao desenvolvimento sustentável. No entanto, o “gargalo deste funil” para muitos produtos e processos, de acordo com Frazzetto (2003), seria a viabilidade econômica.

A utilização de enzimas no processamento de couros, segundo Herrmann (2006), apresenta uma série de vantagens em relação aos processos tradicionais, tais como: economia de tempo, melhor rendimento de área, maior facilidade no tratamento de efluentes, através de redução da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e Demanda Química de Oxigênio (DQO), redução ou até a substituição do uso de reagentes altamente poluentes, como sulfetos, melhor aproveitamento de cromo e corantes pela pele, além da economia de energia e água.

No entanto, o uso desta tecnologia não é novidade para os curtumes, que já utilizavam enzimas desde antes da sua descoberta. A etapa de purga popularizou o uso de enzimas na indústria coureira devido à limpeza que estas promovem à pele e atualmente já existem produtos enzimáticos desenvolvidos para outras etapas do processamento. No entanto, a baixa especificidade destas enzimas disponíveis

comercialmente é um fator limitante da sua aplicação.

1.1. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo aplicar enzimas comerciais nas etapas de remolho, depilação/caleiro e purga com a finalidade de traçar um comparativo entre os processos puramente químicos e os processos coenzimáticos (que aplicam agentes químicos e enzimas). Com esta finalidade, foram desenvolvidos 24 testes em fulões de bancada, com diferentes formulações (químicas e coenzimáticas) para os processos em estudo. Para traçar esta comparação, após a realização dos testes foram feitas análises nos efluentes e nas peles, com o intuito de verificar a qualidade da pele obtida e a quantidade de matéria orgânica removida em cada um. Por fim, foram determinadas, por meio de análises, as atividades de algumas enzimas comerciais frente a colágenos e lipídeos.

1.2. Limitações do Trabalho de Pesquisa

A investigação científica na qual se baseia esta dissertação de mestrado apresenta algumas limitações quanto a sua interpretação. São elas:

- **Pele Utilizada:** Os testes somente utilizaram pele proveniente da região do grupão proveniente de um único animal, cuja finalidade foi atenuar as diferenças de composição existentes entre as regiões de uma mesma pele. No entanto, sabe-se que, mesmo na região do grupão, existem diferenças na composição e por se tratar de material de origem biológica, não é possível eliminar esta variabilidade, apenas atenuá-la por meio de processos de aleatorização das amostras, conforme feito.
- **Escala de Trabalho:** Em função do número de testes feitos e da área útil de pele, utilizou-se a escala de bancada para contemplar todas as etapas testadas (remolho, depilação/caleiro e purga). No entanto, sua utilização foi bastante trabalhosa, uma vez que as formulações co-enzimáticas previam o uso de pequenas quantidades de enzimas, na ordem de 10^{-2} gramas. Logo, supõe-se que também possam existir erros inerentes a pesagem de produtos, principalmente enzimas sólidas, que apresentam substâncias que funcionam como carga, cujo objetivo é a estabilização do produto.
- **Divisão e Descarne:** Após a etapa de depilação/caleiro, usualmente, a

pele passa pelo processo de descarte e divisão, onde a mesma é separada em duas partes e posteriormente é feito o processo de desengalgação. No caso de experimentos em escala de bancada, onde as peles possuem poucos centímetros quadrados de área, não é possível realizar a divisão da pele, logo a etapa de desengalgação das peles utilizadas nos testes de purga não seguiu a formulação fornecida, sendo o controle feito a partir do pH dos banhos.

1.2. Estrutura do trabalho

Este trabalho foi dividido em cinco capítulos. No Segundo Capítulo, encontra-se a revisão bibliográfica dos conceitos fundamentais utilizados neste trabalho, onde são apresentados conceitos relacionados à pele (sua estrutura e composição), bioquímica molecular (aminoácidos, polipeptídeos, proteínas e enzimas), conceitos básicos sobre o processamento de peles, em especial àqueles relacionados às etapas em estudo neste trabalho, e, por fim, o estágio atual de desenvolvimento e utilização de enzimas em curtumes.

A metodologia experimental utilizada neste trabalho é apresentada no Capítulo 3. Neste capítulo são descritos os materiais utilizados (reagentes e matérias-primas), a metodologia empregada nas análises também é apresentada, porém, sua descrição encontra-se nos anexos.

No Capítulo 4, os resultados das análises feitas a partir dos banhos residuais ou peles são apresentados e discutidos, bem como os resultados dos ensaios de determinação da atividade enzimática.

Por fim, no Capítulo 5 são apresentadas as principais conclusões retiradas dos experimentos e algumas sugestões e comentários também foram feitos.

Revisão Bibliográfica

Neste capítulo serão apresentadas informações encontradas na literatura a respeito dos conceitos utilizados no decorrer do trabalho, tais como a histologia da pele, conceitos fundamentais de bioquímica e processamento de couros, além de uma revisão sobre a aplicação de enzimas na indústria coureira.

2.1. Pele

A maior quantidade de pele utilizada na manufatura de couro é proveniente de bovinos, cabras, ovelhas, porcos e búfalos. Peles de coelhos, avestruz, cavalos, animais selvagens e outras classes como répteis, peixes e anfíbios têm menor importância comercial. Para esta indústria as propriedades da matéria-prima são de grande impacto no produto final, pois na maioria dos couros mais de 50% da massa final consiste em proteína originária da pele (HEIDEMANN, 1993c).

A pele de cada espécie animal tem suas características de espessura, comprimento, largura, estrutura fibrosa e desenho de superfície. As propriedades físicas também são específicas. Até mesmo dentro de uma espécie as propriedades das peles são dependentes da raça, idade e hábitos nutricionais do animal. Entretanto, pode-se afirmar que há mais semelhanças que diferenças entre as peles animais, pois as estruturas de proteínas como colágeno, elastina ou queratina são as mesmas em todas as espécies animais (HEIDEMANN, 1993c; GUTTERRES, 2004).

Classifica-se a pele como órgão integrante do sistema tegumentar, pois é um tipo de tecido epitelial de revestimento. Este órgão exerce diversas funções, tais como, regulação térmica, defesa orgânica contra ação patogênica de microorganismos, controle do fluxo sanguíneo, proteção contra choques mecânicos, reserva de nutrientes, além de funções sensoriais (calor, frio, pressão, dor e tato).

2.1.1. Estrutura da Pele

Assim como as demais espécies de mamíferos, a pele dos bovinos é formada basicamente por três camadas, cada qual com sua função e constituição química própria. A camada superior é conhecida como epiderme, a camada intermediária é a derme e a camada inferior é a hipoderme.

Um esquema ilustrativo é apresentado na Figura 1, onde é possível observar as estruturas a partir de um corte de pele.

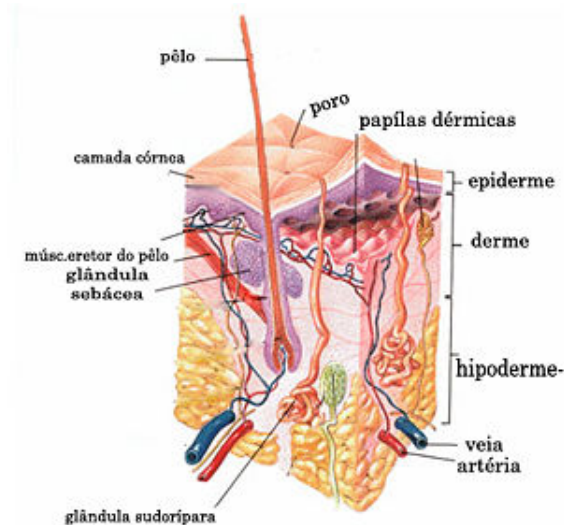


Figura 1: Esquema de um corte de pele;

Fonte: Wikipédia

Epiderme

A epiderme é uma camada estratificada e escamosa (constituída principalmente por queratina), caracterizada pela ausência de matriz extracelular e de vasos sanguíneos, cuja profundidade é variável, alcançando maior espessura em regiões de maior atrito. A origem da epiderme está no estrato basal, ou camada germinativa, região responsável pela formação e posterior diferenciação das células.

O processo de queratinização ocorre a partir do estrato granuloso em células chamadas queratinócitos, onde, à medida que as células vão se diferenciando e se aproximando da superfície, a quantidade de queratina presente aumenta, até a ocorrência da morte celular e sua posterior descamação (HEIDEMANN, 1993c).

A epiderme ainda contém melanócitos e células imunitárias. Os anexos cutâneos (pêlos, folículo piloso, glândulas sebáceas e sudoríparas) também estão presentes na epiderme dos mamíferos, estendendo-se até a derme. A junção entre epiderme e derme tem a forma de papilas, que conferem maior superfície de contato e facilitam a difusão de nutrientes, além de maior resistência ao atrito da pele.

Os folículos pilosos são multifuncionais, eles contêm em sua base, células responsáveis pela regeneração dos pêlos, além de serem responsáveis pela fixação destas na pele. O conhecimento destas estruturas é de extrema importância para a indústria do couro, pois a etapa de remoção dos pêlos no processamento do couro é crucial (HEIDEMANN, 1993c).

Quanto à estrutura, a raiz dos pêlos é localizada no fundo do folículo e consiste de um bulbo capilar cujo diâmetro é maior que o diâmetro da cavidade. O bulbo contém células as quais se diferenciam pelo crescimento, saindo da matriz em direção à cavidade do pêlo. A superfície da cavidade do pêlo é recoberta por material queratinoso, cuja função é dar sustentação ao pêlo. Nesta cavidade existe uma zona de queratinização onde a queratina fracamente formada torna-se uma queratina altamente resistente devido ao alto grau de “*crosslink*” da estrutura (HEIDEMANN, 1993c).

Derme

A derme, ou córium, é a camada de interesse para os curtumes e representa cerca de 85% da espessura da pele bovina. Apenas a derme será transformada em couro após a remoção da epiderme, anexos cutâneos, hipoderme, vasos sanguíneos e sangue. Este tecido é classificado como conjuntivo fibroso, sendo constituído por colágeno e elastina, além de outros elementos da matriz extracelular (água, proteínas estruturais, proteoglicanos e íons). Neste tecido estão localizados os vasos sanguíneos e linfáticos que vascularizam a epiderme e também os nervos e órgãos sensoriais a eles associados, (MONTAGNA, 1962).

Hipoderme

A hipoderme ou subcutis é um tecido conjuntivo adiposo, que tecnicamente não faz parte da pele, entretanto localiza-se abaixo da derme e acima dos músculos. É formada por adipócitos (células com alto conteúdo de triglicérides) que se agrupam em lobos gordurosos, os quais são limitados por fibras colágenas oriundas da derme. A hipoderme participa do isolamento térmico e na proteção contra choques mecânicos e traumas externos, além de atuar como reservatório energético (HEIDEMANN, 1993c).

2.1.2. Composição da pele (constituintes moleculares)

As principais proteínas constituintes da pele são queratinas, na epiderme; colágenos e elastina, na derme; além de triacilgliceróis (mais conhecidos como triglicérides), na hipoderme.

Triacilgliceróis

Também chamados de triglicérides, são um dos tipos de lipídios existentes. Sua estrutura é formada por uma molécula de glicerol (álcool) ligada a três moléculas de ácidos graxos (ácidos carboxílicos de cadeias longas), que podem ser todas iguais ou diferentes, saturadas ou não, porém, quase exclusivamente com cadeias em números pares, como demonstra o esquema da Figura 2.

Óleos (assim classificados por encontrarem-se no estado líquido à temperatura ambiente) ou gorduras (encontram-se no estado sólido) são misturas complexas de triglicérides cuja composição dos ácidos graxos varia de acordo com o organismo que o produz.

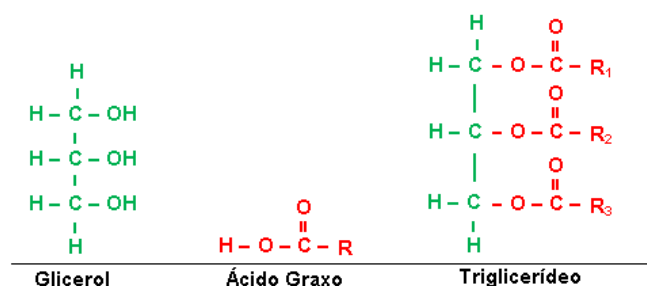


Figura 2: Esquema das moléculas de triglicérides

Sua função principal é a estocagem de energia. Gorduras são capazes de liberar seis vezes mais energia metabólica que a mesma massa de glicogênio hidratado, especialmente nos triglicerídeos saturados, pois cada ligação C – H é um sítio em potencial para a reação de oxidação (VOET *et al.*, 1999e).

Elastina

Elastina constitui entre 2 e 3% do total da proteína encontrada na pele de bovinos adultos, entretanto é encontrada em maiores proporções em vasos sanguíneos, tendões, ligamentos e na camada papilar da pele.

Na pele, a elastina está arranjada na forma de redes fibrilares paralelas à superfície da pele, acumulando-se ao redor dos folículos pilosos, células de gordura, parede de vasos sanguíneos (tanto externamente como internamente) (ROBERT, 2002).

Debelle e Tamburro (1999) e Debelle e Alix (1999), em seus trabalhos, descrevem diversos arranjos para elastina, bem como para o colágeno. Alfa-elastina e kappa-elastina são as unidades mais comuns, que podem se agrupar em estruturas maiores, como tropo-elastina (massa molar de 70 kDa) e pro-elastina (massa molar de 140 kDa).

A molécula de elastina é caracterizada pelo alto conteúdo de aminoácidos apolares: glicina, alanina, prolina e valina, e é confirmada pelo baixo teor de aminoácidos polares básicos: lisina, histidina e arginina (HEIDEMANN, 1993c).

Queratinas

Queratina é uma classe de escleroproteínas que possui duas formas básicas, de acordo com uma classificação evolucionária das espécies, segundo Voet *et al.* (1999f), as queratinas dividem-se inicialmente em α -queratinas, que ocorrem em mamíferos e β -queratinas, que ocorrem em pássaros e répteis.

As α -queratinas podem ainda ser divididas em “*soft*”, encontradas no tecido epitelial e bulbos pilosos e “*hard*” encontradas em pêlos, chifres unhas e outras estruturas mais duras. A diferenciação entre estas duas formas da proteína dá-se pelo conteúdo de cistina que é maior na forma “*hard*” (MARSHALL *et al.*, 1991).

O enxofre é o elemento mais característico de uma queratina, pois se encontra presente em quantidade muito superior, quando comparado a sua presença em outras moléculas orgânicas. Este elemento químico está presente na cisteína e cistina (dipeptídeo resultante da união de dois aminoácidos cisteínas), sendo responsável pela formação das pontes dissulfídicas, que tornam a estrutura mais coesa devido à força deste tipo de ligação. Além das pontes dissulfídicas, pontes de hidrogênio também estão presentes na queratina auxiliando a estabilidade estrutural da proteína, conforme afirmam Magin *et al.* (2007).

A Figura 3 apresenta as estruturas presentes num corte esquemático de um pêlo.

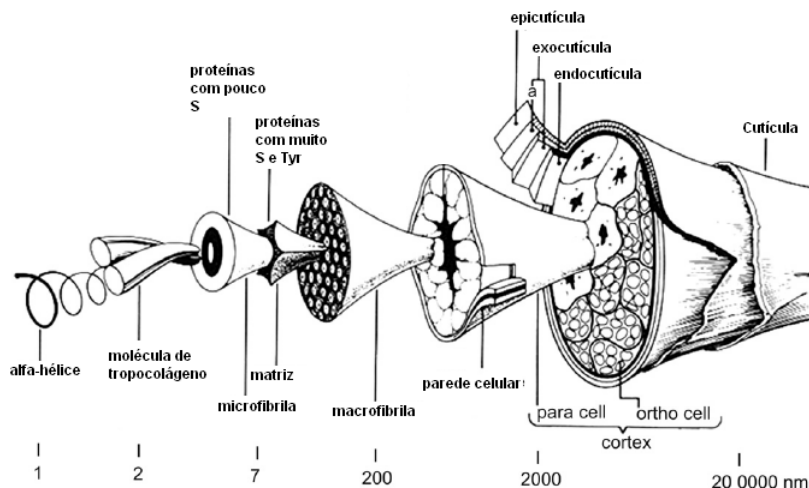


Figura 3: Esquemática das estruturas presentes no pêlo;

Fonte: Sierpinski-Hill *et al.*

Nos pêlos, a queratina pode ser dividida em três grupos distintos, um deles, conhecido como alfa-queratina (não confundir com a classificação anterior) é caracterizado pelo baixo teor de enxofre, em torno de 5% (com conteúdo de cistina correspondendo de 3 a 5%), possui massa molar média entre 45 e 55 kDa, cuja estrutura terciária da molécula é do tipo α -hélice. O segundo tipo, *beta-queratina*, é composto por um percentual de enxofre próximo a 8% (e 20% de cistina na composição de aminoácidos). Estas proteínas são do tipo “não estruturadas” com massa molar média entre 10 e 25 kDa e preenchem os espaços entre elementos fibrosos com uma massa muito sólida. O terceiro grupo chamado gama-queratina é caracterizado pelo alto teor de glicina-tirosina, cuja composição é de 5 a 10% de

cistina, 20 a 35% de glicina e 15 a 20% de tirosina. São proteínas globulares presentes na matriz das microfibrilas e de menor peso molecular (aproximadamente 15 kDa) (SIERPINSKI-HILL *et al, in press.*; HEIDEMANN, 1993c).

Colágeno

O termo colágeno, ou colagênio, designa uma família de proteínas insolúveis fibrosas encontradas em animais multicelulares. Essas proteínas são encontradas no tecido conjuntivo, em ossos, dentes, tendões, pele, músculos, vasos sanguíneos e olhos, corresponde a aproximadamente 25% em massa de todas as proteínas existentes nos mamíferos (VOET *et al.*, 1999f).

A Tabela 2 apresenta as principais características químicas, físicas e físico-químicas das moléculas de colágeno, segundo Gutterres (2004).

Tabela 2: Características especiais do colagênio

Características do colagênio		
Químicas	Físico-químicas	Físicas
<ul style="list-style-type: none"> • Única proteína que tem elevado conteúdo em hidroxiprolina; • Presença de hidroxilisina (específico), alto conteúdo em glicina e prolina e cisteína apenas em traços; <p>Apresenta baixo conteúdo de aminoácidos aromáticos;</p> <ul style="list-style-type: none"> • Em estado natural é decomposto por colagenase, no entanto, não por outras proteases; • Caráter anfótero; • Exibe especial coloração em preparação histológica; 	<ul style="list-style-type: none"> • Solúvel em água quente sob tratamento ácido ou alcali, para formar gelatina ou cola, precipitáveis com substâncias curtentes; • Insolúvel em água fria; • Acima da temperatura de retração retrai a 1/3 do comprimento original; • Inchamento osmótico e liotrópico em condições ácidas ou básicas; • O tropocolágeno sofre desnaturação; 	<ul style="list-style-type: none"> • Estriação específica visível em microscópio eletrônico; • Reflexão de baixo ângulo em raios-X; • Comportamento viscoelástico característico; • Estrutura porosa depois de curtido;

Fonte: Gutterres (2004)

A proteína classificada como colágeno tem como principais características sua conformação em hélice tripla (formada a partir de três cadeias polipeptídicas) e seu conteúdo de aminoácidos, onde a quantidade de resíduos de hidroxiprolina presente é muito superior à quantidade encontrada nas outras proteínas existentes na natureza (LEHNINGER, 1976).

Estrutura molecular e composição

A estrutura primária destas proteínas é determinada pela seqüência dos resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica (α -peptídeos) e responsável pela formação dos diversos tipos de colágeno. Atualmente quase trinta tipos já foram descobertos e embora haja diferença quanto à seqüência de resíduos de aminoácidos nas cadeias, alguns deles se encontram em percentuais fixos em todos os tipos, como glicina, alanina e hidroxiprolina que correspondem respectivamente a 33, 11 e 9% dos resíduos de aminoácidos presentes em cada um dos tipos de colágeno (LEHNINGER, 1976).

A estrutura secundária dos colágenos é bastante semelhante a α -hélice (encontrada na α queratina). Entretanto Pauling e Corey (1951) e Ramachandran e Kartha (1954), com o auxílio da difração de raios-X, observaram um padrão diferente entre estas duas estruturas e concluíram que a estrutura secundária dos colágenos é uma hélice orientada para direita, formada por três cadeias polipeptídicas, onde cada uma das cadeias é uma hélice orientada para a esquerda com passo de três resíduos (tripletos). O esquema destas estruturas é apresentado na Figura 4.

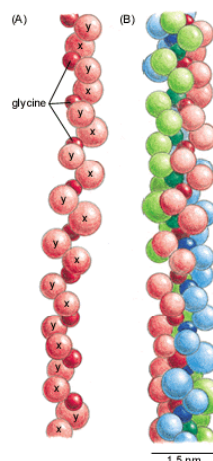


Figura 4: Estrutura de uma típica molécula de colágeno. (A) Modelo para uma única cadeia polipeptídica com esferas representando os aminoácidos. (B) Modelo representativo de parte do tropocolágeno. Fonte: Albert *et al.* (1983)

O triplo mais comum em colágenos corresponde à seqüência de aminoácidos GLI-X-Y, onde GLI representa a glicina, X é freqüentemente prolina e Y algumas vezes é hidroxiprolina e outras é hidroxilisina. Todo terceiro resíduo de cada cadeia polipeptídica passa no centro da hélice tripla, a qual é tão carregada, que somente resíduos de glicina, devido ao tamanho do seu grupamento lateral (um átomo de H), são capazes de se encaixar no interior. Além disso, a glicina é responsável pela coesão da molécula de colágeno (tropocolágeno), pois forma pontes de hidrogênio entre o seu grupamento amino e o oxigênio da carboxila de resíduos da posição X de uma cadeia polipeptídica adjacente. Pela mesma razão, os anéis de prolina e hidroxiprolina apontam pra fora, pois ajudam a estabilizar a hélice.

O conteúdo de aminoácidos é uma característica particular de cada tipo de colágeno e varia com a localização e função de cada um deles. Para o colágeno tipo I, o mais abundante, é apresentada a Tabela 3 que demonstra este perfil.

Tabela 3: Conteúdo de aminoácidos de relevância para o colágeno tipo I

Aminoácido	Conteúdo de aminoácido (%)	Número por molécula
Glicina	33.4	1016
Prolina	12.9	392
Alanina	10.5	319
Hidroxiprolina	9.2	280
Ácido Glutâmico	4.6	140
Glutamina	2.6	79
Arginina	4.8	146
Ácido Aspártico	3.5	106
Aspargina	1.3	40
Serina	2.8	116
Leucina	2.5	76
Lisina	2.5	76
Valina	1.9	58
Treonina	1.7	52
Fenilalanina	1.3	40
Isoleucina	1.1	33
Hidroxilisina	0.7	21
Metionina	0.7	21
Histidina	0.5	15
Tirosina	0.5	15

Fonte: Reich (2007a)

O tropocolágeno pode ser representado por três tripletos (GLI-X-Y)_n, onde n depende do tipo de colágeno. Para o colágeno tipo I, por exemplo, é aproximadamente trezentos e cinquenta, uma vez que cada cadeia polipeptídica possui aproximadamente mil resíduos de aminoácidos. O comprimento da molécula também é variável com o tipo, podendo medir de 150 a 450 nm e o diâmetro gira em torno de 1,5 nm.

Estrutura fibrilar

Via de regra o tropocolágeno agrupa-se formando estruturas maiores. Isto é possível graças às ligações covalentes formadas entre os resíduos de lisinas de moléculas adjacentes, em um processo catalisado por uma enzima conhecida como lisil oxidase. Esta enzima ataca os resíduos de lisina retirando o grupamento amino em cada resíduo, isto faz com que a reatividade do grupamento aldeído seja aumentada. Os aldeídos reagem espontaneamente para formarem entre si ligações covalentes. A Figura 5 ilustra este processo.

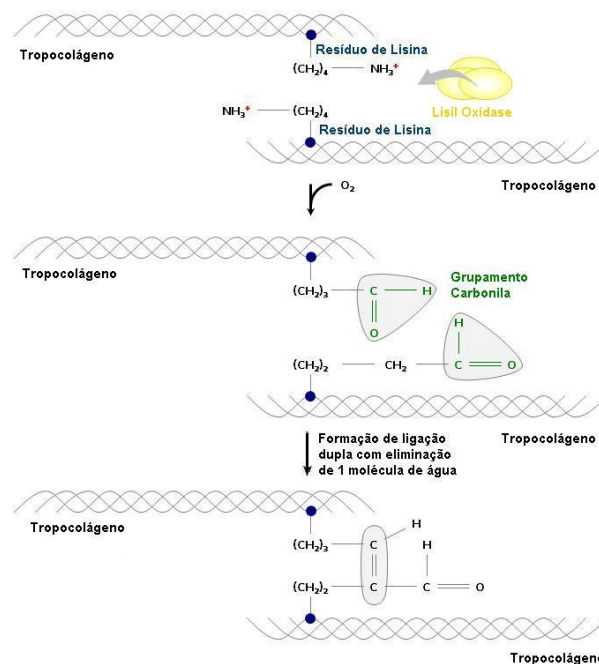


Figura 5: Esquema da ação da enzima lisil oxidase sobre o colágeno.

Fonte: Wikipédia

Smith (1968) estudou a formação destes agregados moleculares de colágenos e concluiu que o tropocolágeno agrupa-se em um estado intermediário no

processo de formação das fibrilas, denominado microfibrila. As microfibrilas de Smith são formadas por sucessivas camadas de cinco moléculas de colágeno, formando um pentágono. Este arranjo tem um diâmetro médio de 4 nm (pois depende do conteúdo de água) e comprimento incalculável, uma vez que o crescimento longitudinal é praticamente ilimitado. Segundo Bailey *et al.* (1980), existem modelos para microfibrilas em triângulos e mais recentemente em octógonos, entretanto, para Reich (2007a), este estado intermediário não é crucial para o entendimento da formação das fibrilas.

As fibrilas têm sido objeto de estudo desde o final da década de cinquenta. Elas são unidas lateralmente formando agregados que possuem diâmetros variáveis entre 100 e 200 nm. Estes estudos tornaram-se possíveis graças ao avanço das técnicas de microscopia eletrônica, como a microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de força atômica. Por meio destes equipamentos foi possível identificar estriações periódicas de 67 nm (conhecidas por períodos D), como no esquema apresentado na Figura 6.

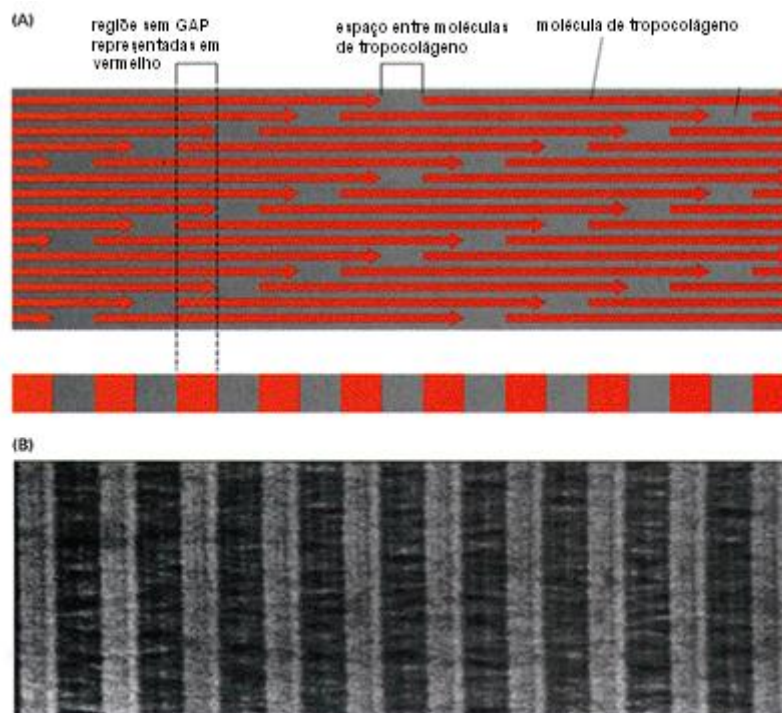

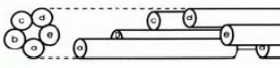
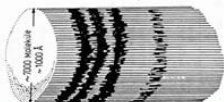


Figura 6: Formação da aparência estriada das fibrilas. (A) a mancha negativa preenche o espaço entre as moléculas, contribuindo para a visualização de uma banda escura. (B) Micrografia de uma fibrila de colágeno; Fonte: Albert *et al.* (1983)

As fibrilas, por sua vez, também formam agregados maiores, as fibras elementares, que dão origem aos feixes de fibras e em última instância, a rede de fibras. O colágeno, portanto, tem um nível hierárquico bem definido, podendo ser resumido na Tabela 4, juntamente com suas principais características.

Tabela 4: Elementos estruturais do colágeno.

<i>Elemento Estrutural</i>	<i>Dimensões</i>	<i>Unidades formadoras</i>
Aminoácidos		H ₂ N-CHR-COOH (exceção para prolina e hidroxiprolina) R variável
Tripeptídeo		3 aminoácidos: Gli-X-Y
Cadeia polipeptídica	1052 aminoácidos	(Gli-X-Y) _n
Molécula de colágeno (Tropocolágeno ou hélice tripla)	Comprimento = 280 nm $\phi = 1,4\text{nm}$	3 cadeias polipeptídicas formando hélice: 2 cadeias α_1 e 1 cadeia α_2 
Microfibrila	$\phi = 4\text{ nm}$	5 moléculas de colágeno alinhadas com deslocamentos longitudinais de 67nm 
Fibrila	$\phi = 100\text{-}200\text{nm}$	≈ 7000 moléculas de colágeno Estriação visível em microscópio eletrônico 
Fibra elementar	$\phi = 2000\text{nm}$	200-1000 fibrilas
Feixe de fibras	Fibras (feixes) de 20 μm na camada papilar e de 200 μm na camada reticular	30-300 fibras elementares
Rede de fibras	Espessura da derme: 2-5mm	Estrutura porosa de feixes de fibras

Fonte: Gutterres (2004)

Tipos de colágeno

Os diferentes tipos de colágenos encontrados são função da polimerização de aminoácidos em α -cadeias e posteriormente, da junção destas cadeias na formação da molécula de tropocolágeno (hélice tripla) ou na combinação de domínios não-helicoidais com domínios em hélice tripla. Uma vez que existem vinte e três α -aminoácidos capazes de gerar proteínas, seria possível formar milhares de tipos de moléculas de colágenos. Entretanto, segundo Reich (2007c), na atualidade são conhecidos em torno de trinta tipos de colágenos. Alguns deles, já foram bastantes

estudados pela ciência por serem mais comuns, e outros, por acompanharem os tipos mais comuns em diferentes proporções. Mas a maioria destes não tem sua função conhecida, o que se descobriu foram apenas as seqüências de aminoácidos das α -cadeias que estão codificadas no DNA da célula.

Gilbert (1998) agrupou os tipos de colágeno de acordo com a semelhança das estruturas, em seis classes distintas:

Classe 1 (formadores de fibras) – Incluem os colágenos dos tipos I, II, III V e XI. Todos estes tipos de colágeno formam fibras, todos têm aproximadamente o mesmo tamanho e todos têm domínios formados por três α -cadeias (polipeptídeos), na forma de hélice tripla. Cada um desses tipos é sintetizado como uma molécula de tropocolágeno, agrupando-se posteriormente em arranjos escalonados, inicialmente em microfibrilas, que então se agregam em fibras. O colágeno do Tipo I é o mais abundante encontrado na pele (corresponde a aproximadamente 27% da pele), tendões, ossos, dentina, menisco e ânulo fibroso (anel externo dos discos da coluna vertebral). O colágeno Tipo II é específico da cartilagem (é o principal colágeno presente nas cartilagens) e humor vítreo (substância gelatinosa que está presente nos olhos). O Tipo III é um colágeno freqüentemente encontrado juntamente com o Tipo I em diferentes proporções, em pele músculos, coração e vasos sanguíneos. Colágeno Tipo V é um colágeno encontrado no tecido fetal, placenta e tecidos intersticiais, co-distribuído com o Tipo I e o colágeno Tipo XI é encontrado na cartilagem, também sendo distribuído com o Tipo I.

Classe 2 (associados a fibrilas) – Inclui os Tipos IX, XII e XIV. São colágenos que possuem a hélice tripla ininterrupta e estão associados às fibrilas. O tipo IX é encontrado na cartilagem e no humor vítreo. Os Tipos XII e XIV são encontrados na pele de embriões e tendões.

Classe 3 (filamentosos) – Somente o Tipo VI é incluído nesta categoria. Trata-se de colágenos encontrados na maioria dos tecidos intersticiais, vasos sanguíneos e músculos.

Classe 4 (não fibrosos) – Inclui os Tipos IV, VIII e X. São colágenos que formam estruturas na forma de folha. O Tipo IV é o maior componente da membrana basal, uma membrana que forma uma superfície dura que dá suporte a pele e

muitos órgãos e é também encontrada na lâmina basal. Este tipo de colágeno tem uma cabeça globular em uma das extremidades e um ramo extra na outra. O tipo VIII é um colágeno encontrado em células endoteliais e membrana córnea. O Tipo X é encontrado em cartilagens em desenvolvimento.

Classe 5 (fibrilas de base) - Inclui apenas o tipo VII, um tipo encontrado no tecido epitelial da pele.

A *Classe 6* é formada por outros tipos de colágenos, como XVII, XIII, XVIII, XVI, XV e XIX. O colágeno Tipo XVII é encontrado nas células do epitélio escamoso da pele. Os demais têm suas funções desconhecidas.

Matriz Extracelular

Os espaços intercelulares, particularmente aqueles ligados a tecidos conectivos como a pele, contêm colágeno e outras proteínas dispersos em uma matriz gelatinosa que é composta por uma larga quantidade de glicosaminoglicanos. Estas estruturas são polissacarídeos (polímeros naturais) constituídos por resíduos alternados de ácido úrico e hexosamina.

Ácido hialurônico é um importante glicosaminoglicano componente do tecido conectivo, assim como sulfato de dermatana e sulfato de queratana.

Quando estes glicosaminoglicanos se conectam a proteínas, formam-se os proteoglicanos, que consistem basicamente de uma cadeia de glicosaminoglicano com diversos núcleos de proteínas ligadas de forma não covalente. A estes núcleos protéicos estão ligados oligossacarídeos (como sulfato de queratana e sulfato de condroitina).

Uma cadeia central de ácido hialurônico, a qual varia seu comprimento de 4.000 a 40.000 Å, pode conter mais de 100 núcleos de proteínas associados, onde, nestas proteínas podem ligar-se aproximadamente 50 cadeias de sulfato de queratana (cada uma com mais de 250 unidades dissacarídicas) e 100 cadeias de sulfato de condroitina (com mais de 1000 unidades dissacarídicas cada). Esta soma faz com que a massa molar dos proteoglicanos varie entre dezenas a milhares de Daltons. Esta conformação dos proteoglicanos é conhecida como “escova de garrafa”, a qual torna estes componentes altamente hidratados (VOET *et al.*, 1999b).

2.2. Noções de Bioquímica

Uma breve revisão sobre aminoácidos e proteínas se faz necessária para o entendimento de enzimas, bem como para complementar o conteúdo apresentado anteriormente neste capítulo (na seção sobre componentes da pele).

2.2.1. Aminoácidos

Aminoácidos têm uma estrutura bastante simples, conforme demonstra a Figura 7, formada por um carbono central, chamado de α -carbono, que é ligado a um grupamento amino, um radical carboxílico, um átomo de hidrogênio e uma cadeia lateral (grupamento R). Este grupamento R é responsável pelos diferentes tipos de aminoácidos existentes. As diferentes combinações dos vinte tipos de aminoácidos padrões geram as diversas proteínas existentes.

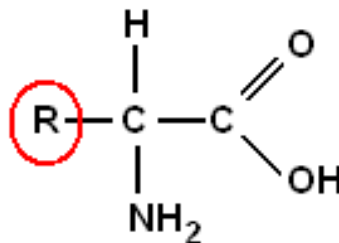
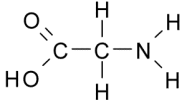
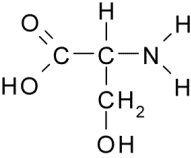
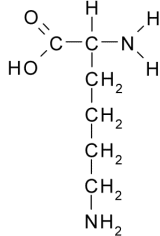
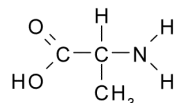
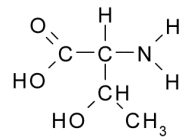
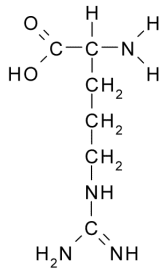
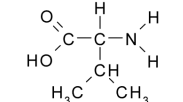
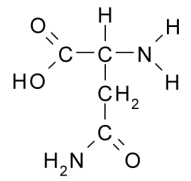
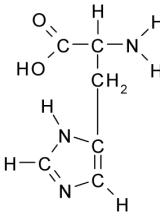
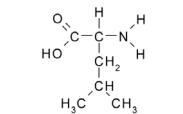
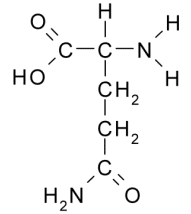
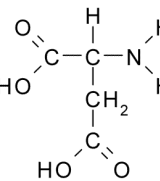
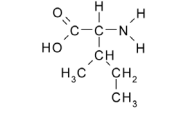
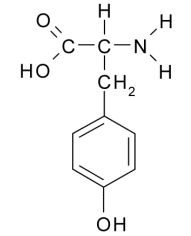
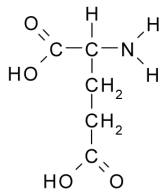
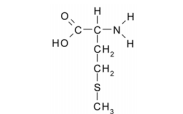
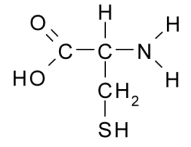
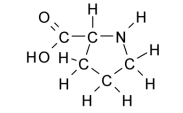
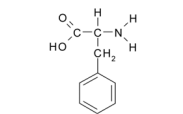
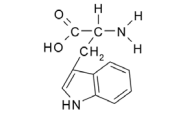


Figura 7: Esquema de um aminoácido.

Os vinte aminoácidos apresentados na Tabela 5 não são os únicos existentes no meio biológico (embora sejam os mais comuns), existem também outros tipos chamados “não padrões”, que muitas vezes desempenham importante papel como constituintes de proteínas e peptídeos biologicamente ativos, embora estejam em menor ocorrência.

De acordo com Voet *et al.* (1999a), a maneira mais comum de classificar os aminoácidos é em três principais grupos, de acordo com o radical R. Os aminoácidos apolares (primeira coluna da Tabela 5) apresentam característica de hidrofobia; aminoácidos polares neutros (segunda coluna) possuem radicais com tendência a formar pontes de hidrogênio e aminoácidos polares com carga (terceira coluna) têm características hidrofílicas.

Tabela 5: Classificação dos aminoácidos padrões.

Aminoácidos com cadeias laterais apolares	Aminoácidos com cadeias laterais polares neutras	Aminoácidos com cadeias laterais polares com carga
 <p>Glicina – Gly – G</p>	 <p>Serina – Ser – S</p>	 <p>Lisina – Lys – K</p>
 <p>Alanina – Ala – A</p>	 <p>Treonina – Thr – T</p>	 <p>Arginina – Arg – R</p>
 <p>Valina – Val – V</p>	 <p>Asparagina – Asn – N</p>	 <p>Histidina – His – H</p>
 <p>Leucina – Leu – L</p>	 <p>Glutamina – Gln – Q</p>	 <p>Ácido Aspártico – Asp – D</p>
 <p>Isoleucina – Ile – I</p>	 <p>Tirosina – Tyr – Y</p>	 <p>Ácido Glutâmico – Glu – E</p>
 <p>Metionina – Met – M</p>	 <p>Cisteína – Cys – C</p>	
 <p>Prolina – Pro – P</p>		
 <p>Fenilalanina – Phe – F</p>		
 <p>Triptofano – Trp – W</p>		

Para formar estruturas maiores, os aminoácidos são capazes de se polimerizar. Este processo pode ser representado por uma reação de polimerização por condensação (onde é gerada uma molécula de água) e é formada a ligação peptídica. De acordo com o número de unidades de aminoácidos, é possível classificar estes polímeros em dipeptídeos (duas unidades), tripeptídeos (três unidades), oligopeptídeos (menos de 20 unidades) e polipeptídeos (mais de 20 unidades).

Após a incorporação em um peptídeo, os aminoácidos individuais (monômeros) utilizados são chamados de aminoácidos residuais. A Figura 8 representa o esquema de formação de uma ligação peptídica.

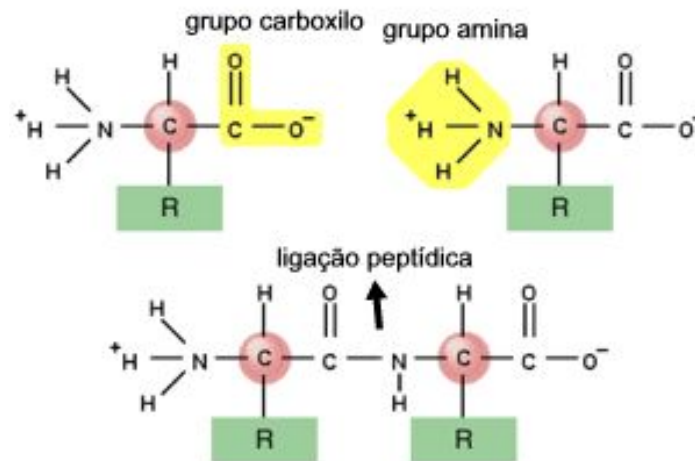


Figura 8: Representação esquemática de uma ligação peptídica;

Fonte: Wikipédia

Polipeptídeos são polímeros lineares nos quais cada resíduo de aminoácido participa de duas ligações peptídicas e está ligado ao outro em uma configuração “cabeça-cauda” (grupamento carboxila ligado ao grupamento amina de outro aminoácido). Os resíduos das pontas participam apenas de uma ligação peptídica e são chamados de N-terminal (aquele resíduo que contém o grupamento amina livre) e C-terminal (o resíduo que contém o grupamento carboxila livre).

2.2.2. Proteínas

Proteínas são moléculas que contêm uma ou mais cadeias de polipeptídeos. A variação no comprimento e na seqüência de aminoácidos dos polipeptídeos

contribui para a diversidade de formas e funções biológicas das proteínas. Na seção 2.1.3 (composição da pele) foram apresentadas algumas proteínas (elastina, queratina e colágeno) que compõem a pele animal.

2.2.3. Enzimas

Enzimas são substâncias normalmente protéicas (algumas são constituídas de RNA) produzidas por organismos vivos que atuam como catalisadores de reações químicas, possibilitando o metabolismo dos seres vivos. A região da enzima onde ocorre a catálise (ligação com o substrato) é conhecida como sítio ativo. Geralmente um sítio ativo consiste em uma reentrância na superfície da enzima, complementar à forma do substrato. Além disso, os aminoácidos residuais que formam o sítio ativo são arranjados de maneira a interagir especificamente com o substrato de forma atrativa (complementação eletrônica).

A eficiência das enzimas é medida em termos da sua atividade. A atividade enzimática é então definida como a quantidade de enzima que converte em produtos uma determinada quantidade de substrato por unidade de tempo.

As forças através das quais o substrato e outras moléculas ligam-se à enzima podem ser do tipo Van der Waals, eletrostática, ponte de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Este modelo, apresentado na Figura 9 para explicar o mecanismo de ligação entre enzima e substrato é conhecido como “chave e fechadura” e foi proposto por Emil Fischer, em 1894 (VOET *et al.*, 1999c).

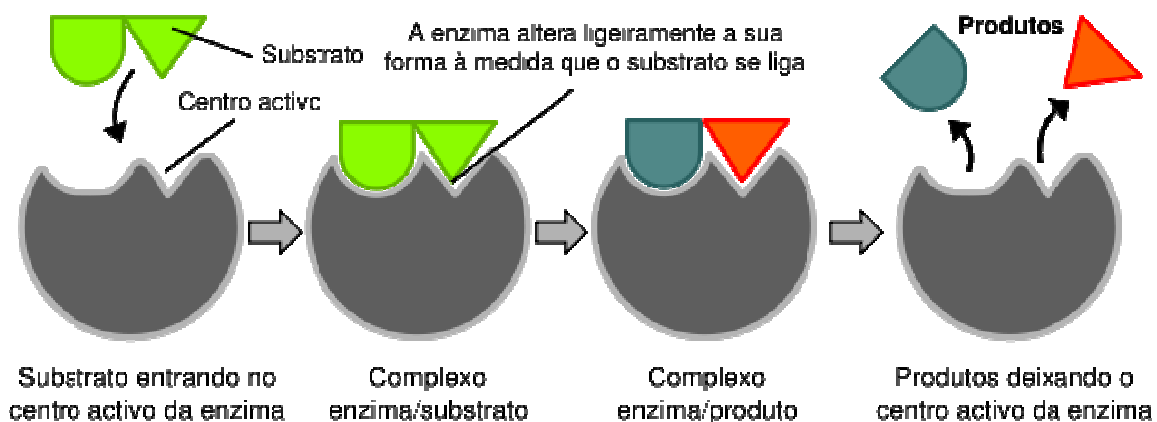


Figura 9: Esquema de funcionamento do mecanismo chave-fechadura;

Fonte: Wikipédia.

Nomenclatura e classificação

Enzimas são usualmente classificadas e nomeadas de acordo com a reação química que elas catalisam. No entanto, um esquema para a classificação sistemática funcional e nomenclatura de enzimas foi adotado pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) devido ao avanço desta ciência com relação ao número crescente de enzimas descobertas. Existem seis grandes classes de reações enzimáticas, apontadas na Tabela 6. Cada enzima possui dois nomes e um número de classificação composto de quatro partes.

Tabela 6: Classificação de enzima de acordo com o tipo de reação

Classificação	Tipo de reação catalisada
Oxidoredutases	Reações de oxidação-redução
Transferases	Transferência de grupos funcionais
Hidrolases	Reações de hidrólises
Liasas	Eliminação de grupos para formar ligas duplas
Isomerases	Isomerização
Ligases	Formação de ligações com hidrólise de ATP

A enzima de nome carboxipeptidase A, tem o nome sistemático de peptidil-L-aminoácido hidrolase e seus números de classificação é EC 3.4.17.1, onde EC significa comissão de enzima e os números representam a classe, subclasse e número de série arbitrário.

Mecanismo de catálise

Enzimas alcançam suas enormes taxas de reação através do mesmo mecanismo utilizado pela catálise química.

Os tipos de mecanismos empregados pela catálise enzimática são classificados como:

- Catálise ácido-base;
- Catálise covalente;
- Catálise metal íon;
- Catálise eletrostática;

- Catálise devido a efeitos de proximidade e orientação;
- Catálise via ligação preferencial pelo estado de transição.

Cinética da Reação

O estudo da cinética de reações enzimáticas teve início em 1902, quando Adrian Brown estudou as taxas de hidrólise de sacarose pela enzima β -fructofuranosidase (VOET *et al.*, 1999d).

Com base no seu estudo, Brown propôs um mecanismo de reação em duas etapas, onde na primeira reação elementar o substrato (S) liga-se à enzima (E) formando um complexo enzima-substrato (ES), na seqüência este complexo é decomposto em produto (P) e enzima, como demonstra a seguinte reação:



Os símbolos k_1 e k_{-1} são as constantes da reação direta e inversa e k_2 a constante da segunda reação. Para fins de simplificação matemática, neste caso (reação de dissociação do complexo ES) não foi considerada a constante k_{-2} , pois para instantes iniciais a concentração de produtos é nula.

A Equação de Michaelis-Menten

Nesta equação, a taxa de formação de produtos é expressa da seguinte maneira:

Equação 1

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [ES]$$

Já para a formação do complexo enzima-substrato, a taxa final de formação é a diferença entre as taxas de consumo de substrato e consumo do complexo:

Equação 2

$$\frac{d[ES]}{d[t]} = k_1 \cdot [E] \cdot [S] - k_{-1} \cdot [ES] - k_2 \cdot [ES]$$

A fim de resolver esta equação, duas simplificações foram propostas em 1913 por Leonor Michaelis e Maud Menten e em 1925 por G. E. Briggs e J. B. S. Haldane,

respectivamente (Voet *et al.*, 1999d):

1. **Suposição de Equilíbrio.** Assumiu-se $k_{-1} \gg k_2$ e desta forma o equilíbrio da primeira reação elementar é descrito como:

Equação 3

$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]}$$

Onde K_S é a constante de dissociação da primeira reação elementar.

2. **Suposição de estado estacionário.** Considerou-se que a concentração de substrato é infinitamente maior que a concentração de enzima ($[S] \gg [E]$). Com exceção ao início da reação, onde nos primeiros milissegundos ocorre a mistura de E e S, a $[ES]$ permanece aproximadamente constante até que o substrato esteja próximo de ser totalmente consumido. Então, a taxa de síntese de ES pode ser considerada igual à taxa de consumo na maioria do curso da reação. Em outras palavras, ES mantém um estado estacionário e $[ES]$ pode ser tratado como constante ao longo do tempo:

Equação 4

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0$$

Para tornar usuais estas expressões, buscaram-se variáveis facilmente mensuráveis. $[ES]$ e $[E]$ não são mensuráveis, entretanto, a concentração total de enzimas $[E]_T$ pode ser facilmente medida:

Equação 5

$$[E]_T = [E] + [ES]$$

Aplicando-se a equação 4 na equação 2 obtemos:

Equação 6

$$k_1 \cdot [E] \cdot [S] = k_{-1} \cdot [ES] + k_2 \cdot [ES]$$

Agora utilizando a equação 5 na equação 6 e manipulando-se os termos obtém-se:

Equação 7

$$\frac{([E]_T - [ES]) \cdot [S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

A constante de Michaelis-Menten (K_M) é definida como:

Equação 8

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Rearranjando a equação 7 obtém-se:

Equação 9

$$K_M \cdot [ES] = ([E]_T - [ES]) \cdot [S]$$

Isolando [ES], obtém-se:

Equação 10

$$[ES] = \frac{[E]_T \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Logo, para um tempo inicial $t = 0$, a equação 1, após a aplicação da equação 10, resulta na seguinte forma:

Equação 11

$$V_0 = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_{t=0} = k_2 \cdot [ES] = \frac{k_2 \cdot [E]_T \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Agora, ambas as concentrações $[E]_T$ e $[S]$ são experimentalmente mensuráveis. O uso da velocidade inicial (operacionalmente é considerada como sendo a velocidade medida antes da conversão de 10% do substrato em produto).

A velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) da reação ocorre a altas concentrações de substrato, quando a enzima está saturada, ou seja, quando a enzima está toda sob a forma ES.

Equação 12

$$V_{m\acute{a}x} = k_2 \cdot [E]_T$$

Aplicando a equação 12 na equação 11, obtém-se abaixo a equação de Michaelis-Menten:

Equação 13

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Esta equação é a base da cinética enzimática. A Figura 10 reproduz o gráfico de Michaelis-Menten, onde a partir do qual é possível obter-se o valor de K_M .

Operacionalmente, K_M é definido como o valor da concentração de substrato para qual a taxa da reação é a metade da taxa máxima ($V_{m\acute{a}x}$).

O K_M é único para cada par enzima-substrato e depende não só da natureza de ambos, como também é influenciado pela temperatura e pH. A constante de Michaelis-Menten pode ser expressa como:

Equação 14

$$K_M = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2}{k_1} = K_S + \frac{k_2}{k_1}$$

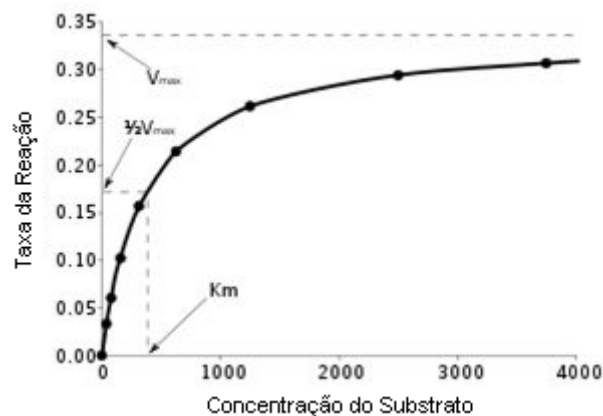


Figura 10: Gráfico da velocidade da reação versus concentração de substrato

Pode-se dizer que K_M é o parâmetro indicativo da afinidade da enzima pelo substrato.

Quando a velocidade de formação do complexo [ES] for maior que a velocidade de dissociação, tem-se:

Equação 15

$$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{\downarrow}{\uparrow} = K_M \text{ pequeno}$$

Um baixo valor de K_M significa que a enzima atinge a eficiência catalítica máxima a baixas concentrações de substrato.

Quando a velocidade de formação do complexo [ES] for menor que a velocidade de dissociação tem-se:

$$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{\uparrow}{\downarrow} = K_M \text{ grande}$$

A constante catalítica (k_{cat}) de uma enzima é definida como:

Equação 16

$$k_{cat} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{[E]_T}$$

Esta constante indica o número de reações que cada sítio ativo da enzima catalisa por unidade de tempo, ou seja, indica a rotatividade do catalisador.

Quando a cinética da reação é simplificada, como no caso de Michaelis-Menten, $k_2 = k_{cat}$. Para casos em que $[S] \ll K_M$, pouquíssimo ES é formado, conseqüentemente $[E] \approx [E]_T$ e a equação 11 reduz-se a:

Equação 17

$$v_0 \approx \left(\frac{k_2}{K_M}\right) \cdot [E]_T \cdot [S] \approx \left(\frac{k_{cat}}{K_M}\right) \cdot [E] \cdot [S]$$

Fatores que influenciam a atividade enzimática

A variação da atividade enzimática (taxa da reação) depende basicamente da concentração de substrato presente no meio, entretanto, sabe-se que outros fatores também influenciam o desempenho das reações enzimáticas, atuando de forma positiva junto ao processo ou atuando de forma a retardar ou até mesmo inibir as reações. Alguns dos fatores mais importantes são apresentados a seguir (VOET *et al.*, 1999c; d).

Cofatores e coenzimas

Reações enzimáticas algumas vezes incluem a participação de outras substâncias no mecanismo de catálise que são essenciais ao processo.

Cofatores são pequenas moléculas, geralmente íons metálicos (Cu^{2+} , Fe^{3+} ou Zn^{2+}) que participam de catálise envolvendo reações de oxidação e redução. A importância destes cofatores explica a necessidade da ingestão de pequenas quantidades de certos elementos na dieta de alguns seres vivos.

Já as coenzimas são substâncias orgânicas necessária à atividade enzimática, como por exemplo, as vitaminas e grupos prostéticos (componentes de origem não protéica, como açúcares).

Efeitos do pH, e temperatura

Enzimas são mais estáveis a temperaturas menores. Assim como as demais proteínas, enzimas podem desnaturar ou perder sua atividade a altas temperaturas, pois são termolábeis, e a atividade pode diminuir se não estiverem nas condições ideais. A condição ideal varia de acordo com a enzima em questão. Para o caso de enzimas obtidas a partir de vegetais, por exemplo, a temperatura ideal normalmente corresponde àquela encontrada na região da qual foram extraídas.

Alguns grupos do sítio ativo das enzimas são protonados, ao mudar o pH do meio pode-se protonar ou desprotonar estes grupos. Alguns substratos também são ionizáveis e não reagem em determinados valores de pH.

Com relação ao pH, no entanto, as enzimas podem reagir de duas formas: trabalhando em um valor de pH ótimo ou atuando em uma determinada faixa de pH (básica, ácida ou neutra).

Inibição

Muitas substâncias alteram a atividade de enzimas pela reversibilidade combinada com um caminho que influencia a ligação com o substrato. Estas substâncias são classificadas como inibidores, podendo levar a uma inibição temporária ou definitiva.

As inibições são classificadas de duas maneiras:

- Inibição competitiva. Neste caso, o inibidor e o substrato possuem analogia estrutural e por esta razão disputam a ocupação do mesmo centro ativo. No entanto, quando o inibidor se coloca no centro ativo, não há formação de produto. Porém, este tipo de inibição pode ser revertida pelo acréscimo de substrato.
- Inibição não competitiva. O inibidor não competitivo combina-se com a enzima através da formação espontânea de ligações covalentes que podem ser compostas com o sítio ativo, com outras regiões da enzima ou com o próprio complexo ES, dependendo da natureza deste inibidor. Em qualquer caso promove uma alteração configuracional irreversível na enzima, alteração que tem como consequência sua inatividade. O resultado final corresponde a uma diminuição da concentração da enzima.

A inibição alostérica é diferente dos dois tipos vistos anteriormente e não existe para prejudicar a enzima, mas para ajudar os organismos em que elas se encontram, sendo considerada um mecanismo de regulação da produção enzimática (RIEGEL, 1996).

2.3. Processamento de Peles

A utilização de peles animais é uma prática criada pelo homem das cavernas, podendo ser consideradas as primeiras vestimentas utilizadas. Obviamente, no início não havia se pensado em nenhum processo que conservasse este material por mais tempo, com exceção à secagem ao sol.

Com o desenvolvimento das civilizações surgiram as técnicas de curtimento vegetal, as quais se tornaram a base da produção de couros, pois a etapa de curtimento era a única existente. Segundo Reich (2007b), o primeiro estudo publicado sobre o curtimento de peles data de 1795, cujo autor, Seguin, foi aluno de Lavoisier. No entanto, a “teoria do curtimento vegetal” só foi publicada após 100 anos por H. R. Procter e J. A. Wilson.

Atualmente, a produção de couros é mais do que apenas o curtimento. Existem diversas etapas que preparam a pele para o curtimento e outras tantas que

conferem acabamento e as propriedades desejadas ao produto final. O processo de produção de couros wet-blue, desenvolvido por A. Schultz e patenteado em 1893 por M. Dennis (patente nº 495028, USA) é até hoje o mais utilizado.

O fluxograma das etapas da manufatura de couros é apresentado na Figura 11.



Figura 11: Fluxograma de processamento do couro (as etapas descritas em retângulos indicam que o processo ocorre em meio aquoso)

O processo que visa transformar a pele crua (verde) ou conservada (salgada) em couro é composto pelas etapas de ribeira, curtimento e acabamento, onde cada uma destas é constituída por diversas operações.

A ribeira é a primeira etapa do processamento, sendo constituída por uma série de operações em meio aquoso, cujo objetivo é a limpeza da pele e preparação para o curtimento. É constituída pelas operações apresentadas abaixo:

- **Bater sal.** Remoção mecânica do sal superficial (previamente adicionado com o intuito de conservar a pele);
- **Pré-remolho.** Lavagem da pele para remoção do excesso de sujeira e sal, e para facilitar o pré descarne (utilizando a pele úmida);
- **Pré-descarne.** Remoção parcial da hipoderme (em máquina descarnadeira), visando o aproveitamento de proteínas e sebo removidos;
- **Remolho.** Processo de limpeza (remoção de sangue, urina, esterco, terra,

sal e algumas proteínas solúveis) e reidratação das peles que ocorre em meio líquido;

- **Caleiro e Depilação.** Processo químico que, por meio do intumescimento da pele e separação das fibras colagênicas, promove a remoção da queratina (presente em pêlos e epiderme);
- **Descarne e divisão.** O descarne remove por ação mecânica (máquina de descarnar) os tecidos adiposo e subcutâneo, visando facilitar a difusão dos produtos químicos nas etapas posteriores. A divisão separa mecanicamente a pele em duas camadas: flor (camada superior) e raspa (camada inferior);
- **Desencalagem.** Processo químico que visa remover substâncias alcalinas adicionadas na etapa de caleiro e solubilizá-las, revertendo o inchamento promovido pela adição de cal no caleiro;
- **Purga.** Processo enzimático que visa uma limpeza profunda da pele, removendo restos de queratina e lipídeos;
- **Píquel.** Processo químico de acidificação da pele, preparando as fibras colagênicas para o curtimento.

A segunda etapa do processamento das peles é o curtimento, cujo objetivo principal é tornar a pele um produto imputrescível. Para tanto, um agente curtente reage com as moléculas de colágeno estabilizando a estrutura por meio de fortes ligações.

Como agente curtente, podem-se empregar sais metálicos (sais de cromo e alumínio), macromoléculas orgânicas (taninos vegetais, poliuretanos e poliácridatos), aldeídos (formaldeído e glutaraldeído) e epóxidos (HEIDEMANN, 1993a). No entanto, sabe-se que 90% dos curtumes empregam os sais de cromo, como o sulfato básico de cromo III (KANTH *et al.*, 2009). Posterior à etapa de curtimento, a pele passa a ser denominada de couro; e quando o curtimento é feito com cromo, o couro é chamado de couro "wet-blue" devido à sua umidade e coloração.

Após curtido, o couro tem sua umidade reduzida e espessura uniformizada por meio de dois equipamentos (enxugadeira e rebaixadeira).

A terceira etapa, acabamento, consiste em operações de recurtimento, pré-acabamento e acabamento final, que têm por finalidade dar aos couros as

características exigidas pela sua aplicação final (estofamento de móveis e veículos, solados, acessórios, calçados, roupas, entre outros).

- Recurtimento. Também conhecido como acabamento molhado, reúne as etapas de lavagem ácida (objetivando a remoção de sais curtentes na superfície), neutralização, recurtimento (define as características físico-mecânicas), tingimento e engraxe;
- Pré-acabamento. Estas operações variam de acordo com o produto final, podendo incluir secagem, estiramento e lixamento;
- Acabamento final. Consiste na aplicação de produtos diretamente sobre a flor por meio de pistolas ou equipamentos especiais, melhorando o aspecto e conferindo efeitos de cor e textura diferenciados.

2.3.1. Operações de Ribeira

As operações de ribeira consistem no foco deste trabalho, portanto serão detalhadas nesta seção. Esta etapa é assim chamada devido à demanda de água elevada envolvida nos processos, isto fez com que, historicamente, os curtumes se instalassem às margens de rios a fim de suprir esta necessidade.

As operações de remolho, caleiro/depilação e purga foram estudadas neste trabalho, onde processos puramente químicos foram comparados a processos que se utilizavam de enzimas. Dentre as operações de ribeira, a purga é a única na qual tradicionalmente se utilizam enzimas.

Remolho

Os objetivos principais neste processo são levar a pele verde ou salgada ao estado de pele fresca (hidratada) e promover a limpeza superficial da pele. Esta operação tornou-se indispensável devido aos processos de conservação pelos quais a pele é submetida. Estes processos, por sua vez, se fazem necessários devido a fatores como a distância entre abatedouros e curtumes, processamento das peles em bateladas, globalização do mercado, entre outros.

Os métodos tradicionais de remolho consistem de um a dois tratamentos feitos em fulão, tanques ou molinetas, em banhos com 100 a 300% de água e temperatura entre 20 e 28°C por um tempo de 6 a 24 horas (GUTTERRES, 2010).

A diferença de tempo mencionada acima se deve ao modo utilizado para conservar a pele. A conservação com sal remove a água presente entre as fibras da pele, que está fracamente ligada à estrutura, já a conservação por secagem vai além, removendo as moléculas que estão fortemente ligadas ao colágeno (isto ocorre quando o conteúdo de água presente está abaixo dos 30%, onde este teor é conhecido como água de hidratação).

Logo, é esperado que o processo de remolho de peles secas seja mais lento, uma vez que o baixo teor de água provoca uma diminuição dos espaços interfibrilares, dificultando o acesso da água no interior da fibra colagênica.

A temperatura da água de remolho também é outro fator a ser levado em consideração. A maior temperatura da água ocasiona um aumento da vibração de suas moléculas, conseqüentemente, levando à liberação de parte da água de hidratação das moléculas de colágeno e resultando em um aumento de superfície, além de eliminação de substâncias da pele e agentes conservantes. Por outro lado, a menor temperatura da água aumenta a absorção desta pelas peles, uma vez que a molécula de água encontra-se num estado mais ordenado, resultando em um aumento de espessura (HEIDEMANN, 1993b).

A ação mecânica também desempenha papel importante. Deve ser intensa, a fim de produzir uma boa lavagem e limpeza, porém, em peles secas é necessário que este processo ocorra apenas após a reidratação da pele, para que a mesma não sofra danos nos processos posteriores.

No remolho, além de água são adicionados alguns agentes, com a finalidade de acelerar este processo, tais como:

- **Ácidos.** Ácido fórmico é o mais comum. Sua utilização está relacionada à preservação do pêlo;
- **Álcalis.** Os mais comuns são hidróxido de sódio, carbonato de sódio ou sulfito de sódio, adicionados em quantidades de 0,1 a 1%. Estes produtos facilitam a umectação e remoção de lipídeos, devido ao efeito de inchamento das fibras e formação de sabões, respectivamente. Além disso, a solubilização das sujeiras, proteínas e proteoglicanos é superior em pH alcalinos;

- **Tensoativos.** Utilizados para acelerar e intensificar o processo de remolho colaboram na umectação da pele, solubilização de sujeiras e emulsão de gorduras;
- **Enzimas.** Segundo Thanikaivelan *et al.* (2004) e Gutterres (2005), o uso de enzimas no remolho tem o objetivo de acelerar o processo, levando a uma reidratação mais eficiente, proporcionar melhor abertura da fibras e conseqüentemente melhora na penetração dos reagentes, por meio da remoção de proteínas interfibrilares, degradação de gorduras e remoção de glicosaminoglicanos e proteínas da pele.

Basicamente, utilizam-se dois tipos de enzima no remolho: proteases e lipases. De acordo com Herrmann (2006), enquanto um remolho tradicional retira em média 4% de sulfato de dermatana (glicosaminoglicano constituinte da matriz extracelular), o remolho tratado com protease microbiana é capaz de remover 42% desta substância.

Segundo Bienkiewicz (1990), proteoglicanos são os componentes mais importante para a elaboração de um balanço de massa na pele, devido à imensa quantidade de água que estas proteínas são capazes de absorver. Estas proteínas são degradadas por álcalis e pela ação das enzimas.

Conforme Heidemann (1993b), ainda está em discussão se a remoção de proteínas interfibrilares (proteoglicanos e glicosaminoglicanos) é essencial para a produção de couro ou se sua liberação é apenas um indicativo de peles bem remolhadas.

Depilação e Caleiro

O processo de depilação é o primeiro grande passo na manufatura de couros, influenciando de forma determinante na qualidade do couro produzido. A pele precisa ter removidos a epiderme e os pêlos, incluindo suas raízes e todo material queratinoso que preenche os folículos pilosos, antes de seguir para o próximo passo.

Para entender o mecanismo de depilação é indispensável que se conheça a estrutura das queratinas. Conforme mencionado na seção 1.2.3 a queratina pode ser classificada em dois grandes grupos, α -queratinas (presente nos mamíferos) e β -

queratinas (presente em aves e répteis). A queratina dos mamíferos pode ainda ser classificada em “*soft*” e “*hard*”. A queratina encontrada nos pêlos é da forma “*hard*”, e pode ser subdividida em três famílias menores: “*alfa*”, “*beta*” e “*gama*” queratinas.

As alfa-queratinas são proteínas estruturais, têm suas estruturas terciárias na forma de uma α -hélice, possuem baixo conteúdo de enxofre e estão localizadas no córtex (camada interna) dos pêlos. As *beta-queratinas* formam estruturas protetoras, compondo grande parte da cutícula (camada externa) dos pêlos. Este tipo de queratina é dificilmente aproveitada, devido ao ataque químico que ocorre na sua superfície. Já as *gama-queratinas*, são proteínas globulares presentes na matriz das microfibrilas, com alto teor de enxofre, que mantém coesa a estrutura das microfibrilas por meio do entrecruzamento das ligações dissulfídicas (SIERPINSKI-HILL *et al.*, in press; HEIDEMANN, 1993c).

O processo de depilação normalmente é feito em meio aquoso, mas também pode ser desenvolvido com a aplicação de uma pasta (este último é mais comum em peles mais finas como as de caprinos ou ovinos que requerem uma ação mecânica mais abrandada). A depilação pode seguir duas rotas distintas: baseado no afrouxamento do pêlo (com a preservação do mesmo) ou baseado na destruição das estruturas queratinosas (GUTTERRES, 2010).

Os processos com afrouxamento do pêlo podem ser de natureza química, enzimática, mecânica ou químico-mecânica. O princípio de funcionamento deste processo está focado no ataque às queratinas do tipo “*soft*”, que se distribuem na epiderme e membrana basal dos folículos pilosos, desta forma os pêlos são afrouxados e removidos (e sua estrutura é mantida preservada). Além de enzimas, produtos químicos como amoníaco, aminas, hidróxidos de metais alcalinos terrosos e hidróxido de sódio também podem ser utilizados para promover a depilação com preservação dos pêlos (GUTTERRES, 2010).

A destruição do pêlo como método depilatório tem por princípio o ataque às queratinas. Neste caso, o ataque ocorre preferencialmente nas estruturas que contêm maior quantidade de cistina, ou seja, nas β e γ queratinas, que estão localizadas na cutícula e na matriz das microfibrilas, respectivamente.

As pontes S-S da cistina podem ser rompidas por redução ou oxidação. A

redução pode ser feita por quase todo o tipo de agente redutor, ocorrendo preferencialmente sob condições alcalinas. Os agentes mais utilizados são tio-compostos, que agem através da troca com um dos átomos de enxofre na ponte dissulfídica da cistina.

A Figura 12 representa um esquema deste tipo de reação, onde é apresentada parte da cadeia de queratina, com ênfase na região da cistina, um agente redutor qualquer e o resultado desta redução.

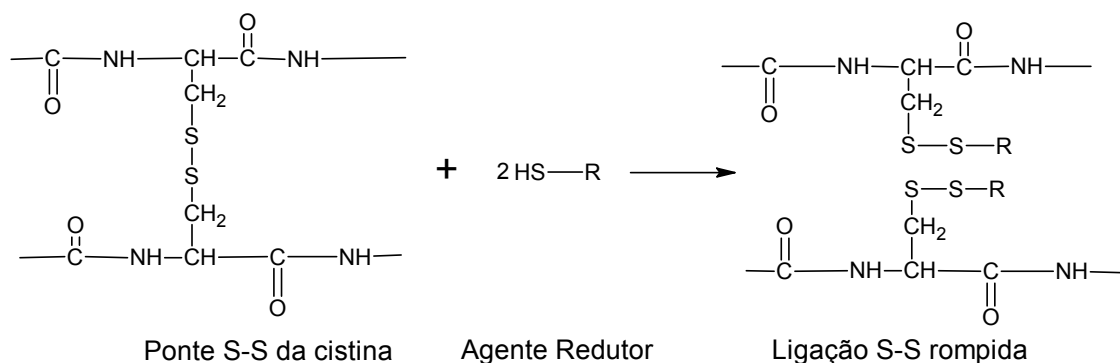


Figura 12: Esquema de rompimento por redução das pontes dissulfídicas da cistina.

Durante a depilação, as proteínas da camada basal da epiderme se hidrolisam formando produtos de degradação que contêm enxofre e posteriormente podem passar a sulfetos, polissulfetos e compostos sulfídricos. Estes, por sua vez, podem atuar sobre a cistina do pelo ou lã, fragilizando a queratina, resultando em maior suscetibilidade ao ataque pelos hidróxidos (GUTTERRES, 2010).

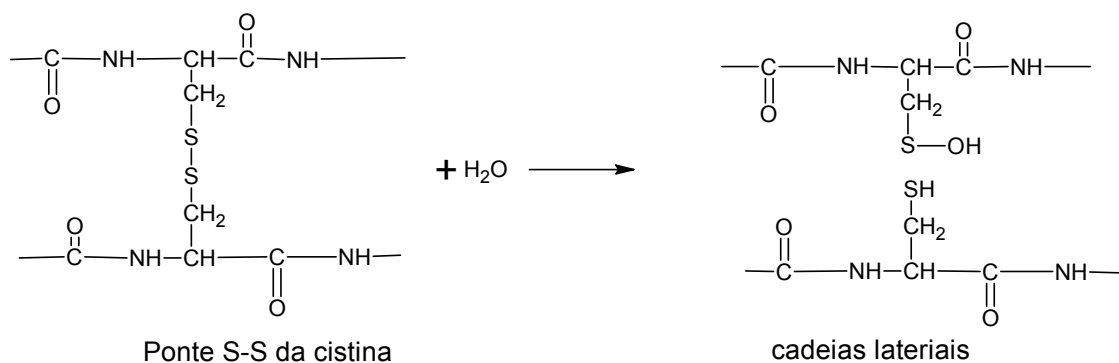


Figura 13: Esquema de hidrólise da pontes de cistina.

A hidrólise das pontes de cistina (catalisada pela presença de álcalis) representada no esquema da Figura 13 pode levar à geração de ácido sulfênico, e, como reação lateral, ácido sulfídrico.

Segundo Marmer e Dudley (2006), agentes oxidantes, tais como percarbonato e perborato de sódio, sistemas cianato/peróxido de hidrogênio, entre outros, atuam na queratina seguindo um mecanismo de reação elementar. A Figura 14 apresenta este esquema, onde o oxigênio representa (de forma simplificada) o agente oxidante.

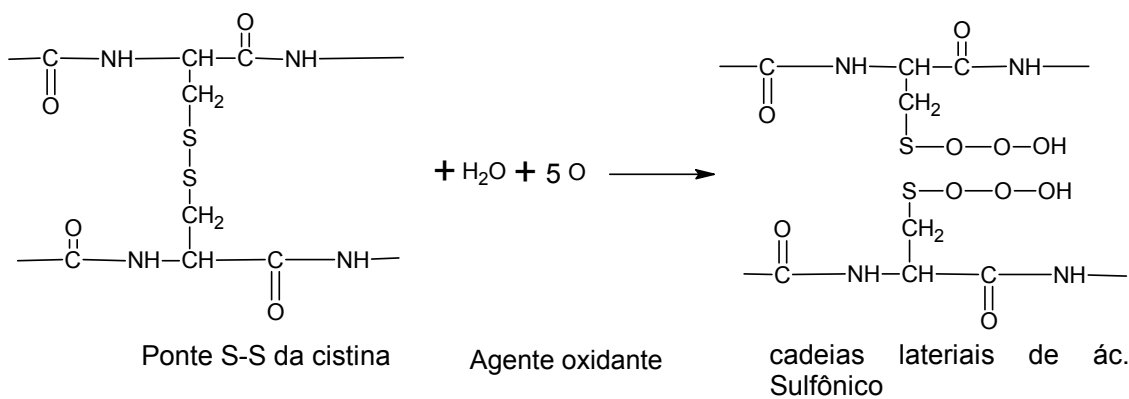


Figura 14: Esquema de rompimento das pontes dissulfetos por agente oxidante.

Para complementar a ação dos agentes químicos, nos processos com destruição dos pêlos, é necessária ação mecânica prolongada, para promover a remoção dos restos de pêlos presos nos folículos pilosos.

O sistema de depilação por redução química conhecido por cal/sulfeto (em especial sulfeto de hidrogênio) é o mais disseminado pelos curtumes, segundo Bajza e Vrcek (2001). Os motivos principais seriam devido ao baixo custo do sulfeto de sódio e da cal, além da eficiência do processo (quando combinado a um longo tempo de processamento, ação mecânica adequada e principalmente à etapa de caleiro com suficiente inchamento da pele).

A utilização de óxido de cálcio no processo conhecido como caleiro tem como objetivo o inchamento da pele para facilitar a remoção de pêlos remanescentes nos folículos pilosos, uma vez que, em água é convertido em álcali.

O hidróxido de cálcio remove a carga elétrica dos grupos básicos existentes no colágeno, modificando as dimensões de suas estruturas. Além disso, segundo Sivasubramanian *et al.* (2008), a cal também atua na eliminação de proteoglicanos da matriz extracelular da pele, o que contribui para a abertura das fibras de colágeno.

Existem dois tipos de inchamento da pele, o liotrópico e o osmótico. O inchamento que ocorre na etapa de depilação e caleiro é uma combinação de ambos.

No inchamento liotrópico, íons livres rompem as forças de atração entre as moléculas filamentosas, separando-as internamente. Esta separação enfraquece a estrutura protéica e favorece o inchamento da estrutura devido à absorção de água ocorrendo um aumento da espessura sem diminuição do comprimento das fibras. Este tipo de reação é irreversível.

Já no inchamento osmótico, a difusão da água ocorre devido à diferença de concentrações entre as duas soluções. Esta membrana permite a passagem da água em busca do equilíbrio de concentrações, da solução mais diluída para a mais concentrada. Neste caso as fibras aumentam a espessura e diminuem de comprimento, porém este é um fenômeno reversível.

Segundo Gutterres (2010), outro fenômeno que pode ser observado no processo de depilação e caleiro em sistemas que se utilizam de sulfeto é a ação da cal sobre as graxas naturais. Os lipídios da hipoderme são compostos principalmente por triglicerídeos, porém, na derme, além destes podem ser encontradas ceras, fosfolipídios e esteróis. No decorrer do processo, as ceras permanecem intactas, enquanto os esteróis são modificados completamente sofrendo hidrólise e posterior saponificação. Este comportamento também pode ser observado no caso dos triglicerídeos, porém, em menor quantidade. Os sabões de cálcio (insolúveis) presentes no processo de caleiro devem-se, então, à reação dos ácidos graxos livres, presentes na pele, com o hidróxido de cálcio, de acordo com a reação esquematizada na Figura 15.

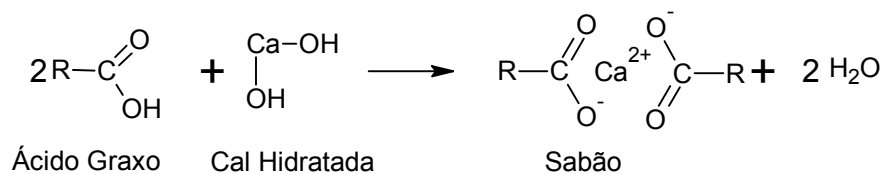


Figura 15: Esquema da formação de sabões na etapa de depilação e caleiro.

O principal problema relacionado ao processo de depilação cal/sulfeto está relacionado à toxicidade destes elementos. O dano ambiental causado pelo efluente que contém estes agentes químicos, traduz-se pela elevação do pH, demanda biológica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), além da geração de sulfetos (como ácido sulfídrico, resultante da reação entre ácidos e sulfeto de sódio), diminuindo, desta forma, a eficiência das estações de tratamento de efluentes.

De acordo com Marsal *et al.* (1999) e Taylor *et al.* (1987), os processos de depilação tradicionais que utilizam cal e sulfeto contribuem com 50 a 60% do total da carga de DBO, DQO, sólidos dissolvidos totais (SDT) e sólidos suspensos totais (SST), além da alta alcalinidade do efluente.

Os métodos enzimáticos de depilação podem ser considerados como um dos mais recentes e também um dos mais antigos já utilizados em curtumes. Em meados do século XIX a depilação era feita por meio de um banho de “remolho em putrefação” ou por “transpiração” da pele úmida, onde era possível conduzir a um afrouxamento do pêlo. A remoção era efetivada mecanicamente.

De acordo com Rui *et al.* (2009), em 1910, Otto Röhm patenteou na Alemanha o primeiro método enzimático de depilação e limpeza das peles e em 1922, J. A. Wilson e G. Daub iniciaram as primeiras pesquisas sobre a depilação enzimática com o uso de microscópios. Na China, entre os anos 60 e 70, a depilação enzimática alcançou uma série de avanços e descobertas, entretanto, devido ao alto custo desta tecnologia e as dificuldades na manufatura, como a perda da estrutura da flor e alargamento dos poros, esta técnica foi abandonada em meados dos anos 80 e o processo de depilação voltou ao sistema cal/sulfeto.

Os mecanismos de depilação enzimática são dependentes do tipo de enzima utilizada, uma vez que cada enzima tem preferência sobre um determinado substrato. Queratinases, proteases em conjunto com α -amilases ou colagenases atuam na depilação de peles, entretanto, possuem mecanismos diferentes, pois cada uma destas enzimas hidrolisa um aminoácido distinto.

O processo depilatório ideal, segundo Rui *et al.* (2009), deveria ser capaz de rapidamente afrouxar a ligação do bulbo piloso à papila e ser capaz de rapidamente efetuar a separação entre camada externa da raiz do pêlo e a estrutura interna do folículo, e, finalmente, deveria ser capaz de causar suficiente destruição celular da camada externa da raiz do pêlo para permitir a fácil retirada deste.

Alguns pesquisadores da década de 70 acreditavam que o processo de depilação estava intimamente ligado à perda de substâncias como a mucina, encontrada na *Camada de Malpighi* (na epiderme); folículos pilosos, camada papilar, glândulas sudoríparas e sebáceas (na derme). Quando a mucina era hidrolisada pela enzima (protease com atividade colagenolítica), a conexão entre pêlos e peles seria enfraquecida.

Atualmente o uso de proteases com atividade sobre colágeno não é recomendado na depilação, uma vez que esta enzima também causa danos às fibras do couro, enfraquecendo a estrutura.

Madhumathi *et al.* (2007) propuseram um processo de depilação utilizando duas enzimas. Uma α -amilase para fazer a abertura da estrutura, e uma protease sem atividade sobre o colágeno, para fazer a depilação. O estudo em questão, apesar de possuir um mecanismo complexo, onde duas enzimas estariam atuando, demonstrou que o desempenho de cada enzima em particular não foi afetado pela presença da outra.

O mecanismo de atuação das queratinases, de acordo com Gupta e Ramnani (2006), não está totalmente elucidado. Para a hidrólise das ligações peptídicas da queratina é necessária a clivagem das pontes dissulfeto. Huber *et al.* (2008) sugerem dois mecanismos propostos para a clivagem desta ligação: através de sulfitolise ou por um tipo de enzimas (dissulfeto redutase).

Purga

Purga é um processo enzimático de proteólise (quebra de proteínas que levam à liberação de peptídeos menores) de resíduos da pele. De acordo com Heidemann (1993b) e Qio *et al.* (2009) a função da enzima é remover, em conjunto com a ação mecânica produzida pelos fulões, proteínas interfibrilares, resíduos de queratina que se encontram dentro ou ao redor dos folículos pilosos, resíduos de sangue que ocasionalmente podem coagular, além de aumentar a abertura das fibras de colágeno.

Os trabalhos de Ding (2003) e Ding e Liang (2005) apontam que além de assumir as funções mencionadas anteriormente, as enzimas também modificam a estrutura das fibras elásticas. Fibras elásticas constituem de 0,1% a 1,0% do peso da derme, distribuídas principalmente na camada papilar e são formadas por elastina (82%) e microfibrilas de colágeno (8%).

De acordo com os trabalhos anteriormente citados, quando a purga é adequada, as mudanças morfológicas nas fibras elásticas são leves e as fibras de colágeno sofrem uma abertura que não danifica as fibrilas colagênicas. Já uma purga extensa leva a danos estruturais, tanto às fibras elásticas quanto às fibrilas de colágeno, com excessiva abertura das fibras e grande perda desta proteína (colágeno).

Historicamente, esta etapa foi pioneira na aplicação de enzimas pelos curtumes, onde inicialmente se utilizavam fezes animais. O principal problema ocasionado pelo uso de excrementos, além do desagradável manuseio, está relacionado à variação da atividade enzimática (até aquele momento desconhecida), pois muitas vezes a mesma quantidade utilizada poderia levar a uma purga mal realizada, ou então à purga excessiva das peles, uma vez que não existia um controle na quantidade e atividade das enzimas presentes nos excrementos.

Mais tarde, com a descoberta da existência e função das enzimas, foi utilizado pâncreas bovino moído para purgar peles, o qual produz uma mistura de enzimas conhecida como pancreatina, formada principalmente por amilase (a qual atua nos amidos), lipase (cujo substrato preferencial é a gordura) e tripsina (enzima de ação proteolítica). Com isto, os problemas devidos à composição do preparado

enzimático diminuíram, uma vez que a homogeneidade da mistura e da atividade é maior nestes casos.

Com o avanço das técnicas de isolamento e cultivo de microorganismos, atualmente na purga são utilizadas proteases de fungos e bactérias, além das tripsinas isoladas a partir da pancreatina de origem animal, em processos com duração variável entre trinta minutos e uma hora.

Os resíduos de pêlos remanescentes ao fim desta etapa não serão removidos em etapas posteriores e irão influenciar o aspecto final do couro. Segundo Ahmed e Gasmelseed (2003) e Ding e Liang (2005), uma purga mal realizada pode afetar a qualidade do couro acabado, com o surgimento de manchas escuras ou toque áspero. Ao contrário, uma purga bem sucedida, melhora as características como aparência uniforme dos grãos, maciez e elasticidade, evidenciados pela eliminação dos resíduos de queratina da pele. Qio *et al.* (2009) afirmam que os produtos químicos na etapa de purga não são capazes de substituir enzimas com a mesma resposta.

2.4. Uso de Enzimas em Curtumes

Enzimas sempre foram utilizadas nos curtumes, nas etapas de purga, sendo aplicadas mesmo antes de sua descoberta. Entretanto, como mencionado anteriormente, elas já foram utilizadas nos processos de depilação, no início do século passado, antes do desenvolvimento dos processos químicos de depilação.

Estas proteínas ganham cada vez mais destaque, por serem consideradas tecnologias ambientalmente corretas e também devido ao avanço da ciência de purificação, desenvolvimento e aperfeiçoamento de enzimas. Atualmente enzimas são aplicadas em diversas etapas do processamento de couro, desde a ribeira, até o acabamento, como demonstram os trabalhos de Gutterres *et al.* (2009), Aquim *et al.* (2008), Thanikaivelan *et al.* (2005) e Choudhary *et al.* (2004).

No remolho, enzimas são aplicadas para encurtar o tempo de produção por meio do ataque às gorduras solidificadas e proteínas não colagênicas, que às vezes estão recobrando a superfície externa da pele e dificultando o acesso das fibras de colágeno à água. Além de visar a reidratação do colágeno, as enzimas contribuem

para a eliminação de proteína interfibrilar. Os tipos de enzimas utilizadas no remolho são preferencialmente lipases e proteases.

A utilização de enzimas na etapa de depilação e caleiro tem como meta a diminuição do impacto ambiental do efluente gerado nesta etapa, através da eliminação (ou diminuição) do uso de cal e sulfetos. Além disso, uma melhora na qualidade das peles, em termos de eficiência depilatória, é verificada com o uso de enzimas.

Processos de depilação coenzimáticos (uso de enzima em conjunto com agentes químicos depilantes) foram desenvolvidos nos trabalhos de Valeika *et al.* (2009), Dayanandan *et al.* (2003), Aravindhana *et al.* (2007) e Saravanabhavan *et al.* (2003). Em todos os casos, uma diminuição nos níveis de DQO e DBO foi verificada, embora alguns destes trabalhos tenham utilizado cal para promover o inchamento da pele.

A depilação enzimática tornou-se uma alternativa tecnicamente viável. De acordo com as publicações de Sivasubramanian *et al.* (2008), Dayanandan *et al.* (2003), Macedo *et al.* (2005) e Sivasubramanian *et al.* (2008), existem enzimas capazes de promover a depilação sem auxílio de agentes químicos, nos mais variados tipos de processo (depilação com pasta, depilação em fulão e depilação com aplicação de pasta no carnal).

Os trabalhos de Saravanabhavan *et al.* (2005), Saravanabhavan *et al.* (2008) e Bhavan *et al.* (2008) eliminam a aplicação de cal para promover o inchamento das peles e utilizam metasilicato de sódio com esta função, provando que a ação de proteases é aumentada na presença deste composto. Além do benefício ambiental deste processo, que é livre de cal e sulfeto, um ganho de 8% em área foi observado, tornando viável de forma técnica e econômica este método, conforme sugerem os autores.

Na purga, seu uso é tradicional, entretanto, Ahmed e Gasmelseed (2003) e Ding e Liang (2005) encontraram uma alternativa que utiliza matéria-prima local disponível (pâncreas bovino), diminuindo a dependência dos curtumes com relação às empresas multinacionais.

Uma das descobertas mais recentes para aplicação de enzimas é seu uso no pré-curtimento, objetivando uma maior exaustão do banho de curtimento (maior número de “*cross-link*” e menor desperdício do agente curtente). De acordo com Kanth *et al.* (2009) e Aravindhhan *et al.* (2007), os resultados são motivantes do ponto de vista ambiental.

Seguindo esta mesma linha de pesquisa (exaustão do banho), Yuan *et al.* (2008) e Parvinzadeh (2007), aplicaram enzimas proteolíticas no acabamento molhado de couros, na etapa de pré-tingimento e tingimento de lãs. Os autores verificaram melhorias em propriedades como afinidade ao corante, exaustão do banho, uniformidade da cor e penetração do corante, e, nas peles; molhabilidade da fibra, absorção do corante, diminuição do encolhimento e melhoria da tensão de estiramento de fibras de lã.

Embora estas aplicações tenham impacto direto na melhoria do efluente gerado, não podem ser consideradas tratamentos de efluentes e resíduos. No entanto, existem trabalhos voltados ao tratamento de resíduos, que aplicam enzimas na recuperação de cromo e proteínas de resíduos de aparas curtidas, tais como os de Cantera *et al.* (2002), Kolomaznik *et al.* (2008), Jian *et al.* (2008) e Amaral *et al.* (2008), bem como na produção de hidrolisados de colágeno a partir de aparas não curtidas (BAJZA, 2001).

Metodologia Experimental

Neste capítulo será feita a descrição das etapas envolvidas na elaboração da parte experimental deste trabalho. Inicialmente serão apresentados os materiais utilizados para a realização da etapa experimental (pele, produtos químicos e enzimas). Em seguida, será mostrado o método de aleatorização das amostras de pele utilizadas. Na seqüência, serão descritos os testes realizados e apresentadas as formulações utilizadas. Por fim, serão apresentados os métodos utilizados nas análises dos testes realizados.

3.1. Pele

Para a realização deste trabalho foi utilizada uma pele bovina da raça zebuína, conservada pelo processo de salga e previamente descarnada, proveniente do curtume Kern-Mattes, localizado na cidade de Portão, Rio Grande do Sul.

A Figura 16 apresenta a representação de uma pele bovina, onde a imagem do lado esquerdo ilustra as principais regiões do animal e a imagem da direita apresenta a divisão da pele ao meio (uma vez que alguns curtumes trabalham com peles divididas ao meio, para facilitar o manejo e processamento), enfatizando a região do grupão.

Para a produção de couros, a região do grupão possui maior importância, pois é uma grande região com propriedades homogêneas. No controle de qualidade dos couros produzidos, as normas técnicas nacionais e internacionais recomendam a retirada de amostras da região do grupão, como a norma ASTM (D2813/2008).

Logo, neste trabalho, também foram utilizados apenas pedaços de peles provenientes do grupão, de modo que as regiões da barriga (flancos), cabeça e ancas foram aproveitadas para testes prévios de Hammes (2009), em seu trabalho sobre o estudo da ação enzimática na etapa de remolho.

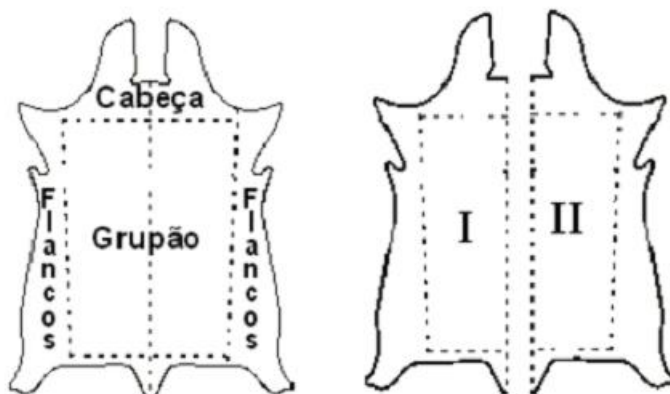


Figura 16: Esquema de uma pele bovina. Principais regiões (esquerda) e divisão em meias peles (direita); Fonte: Gutterres (2010)

A Figura 17 apresenta a fotografia da pele utilizada nos experimentos, onde a região da cabeça está na parte superior da fotografia, conforme o esquema apresentado na Figura 16.



Figura 17: Fotografia da pele bovina utilizada nos testes

Após a remoção dos flancos, ancas e cabeça, a região restante apresentou uma área aproximada de 1,63 m², distribuída em duas partes que foram subdivididas em 54 pedaços menores, cuja área média de cada um era de aproximadamente 400 cm².

Este esquema de corte da pele está apresentado na Figura 18, onde é possível ver o esquema utilizado no mapeamento das amostras de pele. É importante salientar que a faixa central de 10 cm de largura foi desprezada, uma vez que esta faixa da linha dorsal do animal tem uma rigidez maior, e deve ser desprezada por recomendações das normas.

Após serem cortados, os 54 pedaços de peles foram identificados por Letras e números, como indica a Figura 18, e foram armazenados sob refrigeração até o momento do seu uso nos testes. Em função do número de testes realizados e da massa de pele requerida em cada teste, não foi possível realizar a réplica dos testes.

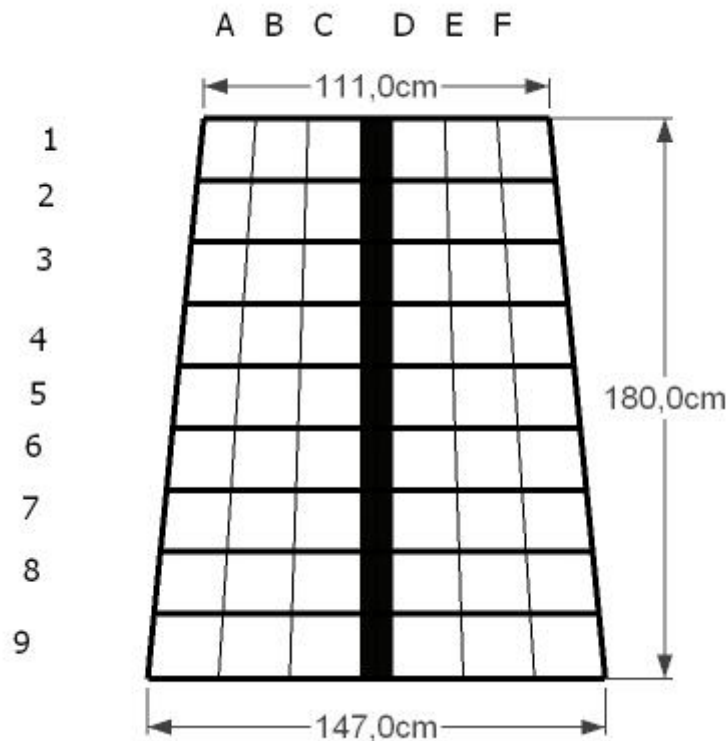


Figura 18: Esquema de divisão da pele

3.2. Produtos Químicos

Foram necessários, para a realização dos testes e análises, diversos produtos químicos, cujo objetivo principal era prover as condições ideais para o desenvolvimento das reações químicas, tanto as envolvidas nos processos estudados, quanto àquelas que ocorreram nos métodos analíticos.

A Tabela 7 apresenta todos os insumos químicos utilizados na realização dos testes de ribeira dos experimentos.

Tabela 7: Relação dos produtos químicos empregados na fase de teste das formulações

Etapa de Uso	Nome do Produto	Objetivos	Observações
Remolho, depilação e caleiro, purga e desencalagem	Busperse 215 [®]	Auxiliar o desengraxe das peles e emulsificar as gorduras naturais;	Tensoativo da Buckman indicado para processos enzimáticos;
Remolho, depilação/caleiro e desencalagem	Eusapon LDE [®]	Auxiliar o desengraxe das peles e emulsificar as gorduras naturais;	Tensoativo da Basf
Remolho	Carbonato de Sódio	Aumentar a velocidade da reidratação por meio do efeito osmótico e formar sabões com os ácidos graxos da pele;	
Depilação/caleiro	Hidróxido de Cálcio	Promover o inchamento e intumescimento da pele;	
Depilação/caleiro	Sulfeto de Sódio	Promover a quebra das pontes dissulfídicas (depilar a pele);	
Depilação/caleiro	Molescal LND [®]	Proporcionar limpeza das peles e combater o inchamento excessivo;	Auxiliar de caleiro da Basf
Desencalagem	Sulfato de Amônio	Diminuir o inchamento da pele através da remoção do hidróxido de cálcio presente entre as fibras;	
Desencalagem	Decaltal ESN [®]	Auxiliar a remoção de Cálcio da pele;	Agente de desencalagem Basf isento de N

Nesta seção, serão apresentados os reagentes químicos utilizados nos testes de ribeira nas etapas de remolho, depilação/caleiro, desencalagem e purga, tanto no processo químico quanto no processo coenzimático. Alguns destes reagentes são desenvolvidos especificamente para a indústria curtidora, sendo produzidos por empresas que atuam no fornecimento de insumos para o setor, outros, no entanto, são reagentes de uso comum em laboratórios ou indústrias.

Os reagentes de uso industrial foram doados pelas empresas Basf e Buckmam ao Laboratório de Estudos em Couro e Meio Ambiente (LACOURO), para a realização desta dissertação e também para outros estudos desenvolvidos pelo grupo de trabalho.

Tensoativos, ou surfactantes, como também são chamados, são produtos utilizados para diminuir a tensão superficial de líquidos. São compostos por uma parte solúvel em água e outra parte insolúvel, podendo atuar como detergentes, dispersantes, emulsionantes, umectantes e solubilizantes.

O auxiliar de caleiro, Molescal LND[®] é uma solução de compostos orgânicos isenta de sulfeto de sódio e com efeito redutor, que auxilia o afrouxamento dos pêlos e reduz o inchamento da pele.

O agente de desencalagem, Decaltal ESN[®], segundo o fabricante, é fabricado a partir de uma mistura de sais e ácidos orgânicos e inorgânicos, cuja composição é isenta de nitrogênio, elemento presente em sais amoniacais, muitas vezes empregado na desencalagem, que neste caso foi evitado, pois é um agente de contaminação das águas.

3.3. Enzimas

As enzimas utilizadas foram fornecidas por três empresas do setor de insumos para curtumes que não terão seus nomes citados neste trabalho, uma vez que o objetivo principal destes testes foi verificar a eficácia das enzimas disponíveis comercialmente para o setor coureiro, e não a divulgação ou desvalorização de uma marca específica.

As empresas serão identificadas pelas letras A, B e C e as enzimas por algarismos de 1 a 4. Ao todo, foram utilizadas oito enzimas (uma em pó, fornecida

pela empresa A, três líquidas fornecidas pela empresa B e quatro em pó fornecidas pela empresa C), como pode ser verificado na Tabela 8, juntamente com demais dados disponibilizados pelos fornecedores em catálogos, sites, ou na rotulagem dos produtos.

Tabela 8: Relação das enzimas utilizadas no experimento

Nome da Enzima	Aplicação	Fonte	Etapa	Teste nro
A1	Enzima de purge	mistura de extratos pancreáticos e sais	Purga	1,2
B1	Lipase	não informada	Remolho, Depilação/Caleiro	4,5,6,12 5,6
B2	Protease	não informada	Remolho, Depilação/Caleiro	4,5,6, 11 5,6
B3	Enzima de purge	não informada	Purga	3,4
C1	Enzima para remolho	enzima microbiana	Remolho	7,8,9
C2	Enzima para caleiro	enzima microbiana	Depilação/Caleiro	3,4
C3	Enzima de purge	extrato pancreático	Purga	5,6
C4	Lipase	enzima microbiana	Depilação/Caleiro	3,4

As orientações dos fabricantes quanto ao processo na qual as enzimas poderiam ser utilizadas, os limites percentuais de aplicação, faixa de pH do meio, além da temperatura, quando disponibilizadas, foram obedecidas, de modo que as enzimas A1, B3 e C3 foram utilizadas na etapa de purga, a enzima C1 foi aplicada apenas na etapa de remolho, a enzima C2 apenas na depilação/caleiro. As enzimas B1, B2 e C4 são indicadas tanto para remolho quanto para caleiro de acordo com o fabricante. No entanto, a última foi utilizada apenas no caleiro, pois segundo o fabricante C, a enzima C1 também apresenta atividade lipolítica, dispensando o uso conjunto de outras enzimas.

3.4. Procedimento Experimental

A etapa experimental foi realizada no Laboratório de Estudos em Couro e

Meio Ambiente (LACOURO) do Departamento de Engenharia Química (DEQUI). Os experimentos foram conduzidos em fulões de bancada com controle de rotação e temperatura (por meio de imersão dos fulões em banho).

Como pode ser visto na Figura 19, os testes foram realizados em batelada de três fulões, que corresponde à capacidade máxima do equipamento. Cada fulão de bancada é capaz de processar aproximadamente 500 g de pele.



Figura 19: Fotografia dos fulões de bancada utilizados na realização dos experimentos

A etapa experimental teve início com a preparação da pele. Como mencionado na seção 3.1, os experimentos utilizaram apenas a parte do grupão, por ser mais homogênea, tanto em termos de espessura quanto em composição de fibras. O grupão foi separado em lado direito e esquerdo e a faixa central do lombo de aproximadamente 10 cm foi removida. Após isso, cada uma das metades do grupão foi subdividida em vinte e sete pedaços menores de aproximadamente 400 cm² (20 X 20 cm). Para chegar a este valor foi feita uma avaliação prévia do volume de água consumido em cada análise realizada.

Inicialmente, na etapa de remolho (para o efluente), foram previstas as

análises de teor de cloretos, sólidos totais fixos e voláteis e nitrogênio NTK. Somando as quantidades de banho necessárias para cada teste, sendo estes realizados em triplicata, chegou-se ao valor de 231 ml de banho, valor esse que foi aproximado para 250 ml.

Outra consideração feita foi que, no remolho, a pele absorveria no máximo 35% do seu peso em massa de água. Desta forma seriam necessários aproximadamente 400 ml de banho para garantir que ao final do processo houvesse quantidade suficiente de efluente para realização dos testes. Sendo a quantidade de água adicionada na formulação de remolho em 200%, seria preciso 200 g de pele em cada fulão. Este padrão de massa de pele necessária em cada fulão também foi adotado para os processos de depilação/caleiro e purga.

O passo seguinte foi estimar a massa específica da pele. Para tanto, algumas amostras de pele foram medidas e pesadas, chegando-se a conclusão que, para a pele em questão a densidade média era de 0,5 g/cm². A partir deste dado, concluiu-se que os pedaços da pele deveriam medir 20 X 20 cm, como mencionado anteriormente.

A fim de garantir que os resultados não sofressem influência com relação à região da pele, foi feita uma aleatorização das amostras, cujo esquema é apresentado na Figura 20. Este processo de aleatorização consistiu em pegar dois pedaços do lado esquerdo e dois pedaços do lado direito do grupão (de regiões não muito próximas) e dividi-los em quatro partes iguais. Após a divisão foram montados quatro conjuntos (onde cada conjunto abastecia um fulão) contendo 1/4 de cada um dos pedaços das peles utilizadas.

Após a divisão da pele, foi realizada a caracterização da mesma, onde foram analisados o teor de substâncias extraíveis com diclorometano, ou, como também é chamado, análise do teor de gorduras (ABNT, NBR 11030/1997), teor de matéria volátil (ABNT, NBR 11029/2001) e o teor de nitrogênio e substâncias dérmicas em peles (ASTM, D2868/2007).

Este procedimento de aleatorização das peles foi adotado em todos os testes de remolho, depilação/caleiro e purga estudados neste trabalho.

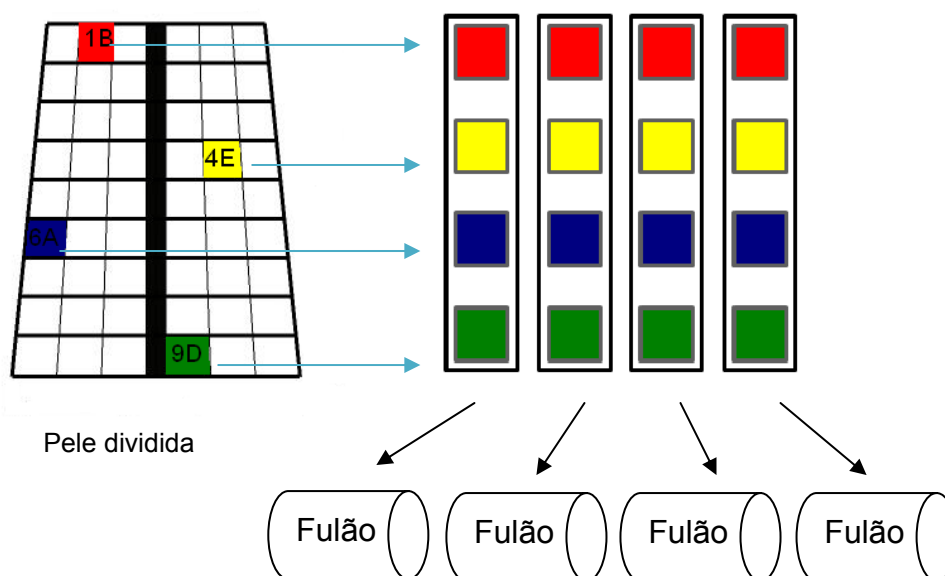


Figura 20: Representação do esquema de aleatorização das amostras de pele para realização dos testes

A metodologia adotada para os testes é bem simples. Como mencionado no início desta seção, as peles foram cortadas, identificadas e acondicionadas sob refrigeração. Após a escolha e o corte das peles (cada pedaço de 20 X 20 cm foi novamente dividido em 4 partes iguais), o sal em excesso foi removido (substituindo a operação de bater sal), os conjuntos de pele foram pesados e as peles foram para os fulões, juntamente com os insumos e a água (para uniformizar o processo foi utilizada água destilada em todos os testes), que foram calculados em função da massa de pele contida em cada fulão.

Os itens seguintes apresentarão as formulações utilizadas nas etapas de remolho, depilação/caleiro, desencalagem e purga. Os objetivos de cada etapa já foram discutidos no capítulo 2, bem como a função dos insumos na seção 3.2 e a apresentação das enzimas na seção 3.3.

3.4.1. Remolho

Na etapa de remolho foram desenvolvidas seis formulações distintas, que se desdobraram em doze testes, pois três destas formulações foram aplicadas com variação de tempo. A formulação de cada um destes testes pode ser vista na Tabela 9, onde são apresentados a duração dos testes e o percentual de aplicação dos

insumos, calculados sobre o peso do conjunto de peles presentes nos fulões.

Os testes de 1 a 3 foram chamados de químicos, uma vez que não utilizavam enzimas. Estes testes diferiam entre si pela duração, que variou entre 1 a 4 horas.

Os testes de 4 a 12 são todos co-enzimáticos, entretanto, entre os testes 4 a 6, foi utilizado um tipo de enzima e a única diferença entre eles está relacionada ao tempo, assim como entre os testes 7 a 9, que utilizavam outro tipo de enzima e também diferem apenas pelo tempo de processamento. O teste 10 é uma variação do teste 9, onde foi dobrada a concentração da enzima. Os testes 11 e 12 são variantes do teste 4, onde são aplicadas apenas as enzimas B2 (protease) e B1 (lipase), respectivamente.

Tabela 9: Formulações utilizadas nos testes das etapas de remolho

	Tempo de processor (horas)	Água	Carbonato de Sodium	Tipo e percentual de Enzima aplicado	Nome e percentual do tensoativo empregado
Teste 1	1	200	0,3	0	Elsapon LDE- 0,15
Teste 2	2	200	0,3	0	Elsapon LDE - 0,15
Teste 3	4	200	0,3	0	Elsapon LDE - 0,15
Teste 4	1	200	0,3	B1 - 0,03 B2 - 0,07	Busperse 215 - 0,02
Teste 5	2	200	0,3	B1 - 0,03 B2 - 0,07	Busperse 215 - 0,02
Teste 6	4	200	0,3	B1 - 0,03 B2 - 0,07	Busperse 215 - 0,02
Teste 7	1	200	0,3	C1 - 0,3	Busperse 215 - 0,02
Teste 8	2	200	0,3	C1 - 0,3	Busperse 215 - 0,02
Teste 9	4	200	0,3	C1 - 0,3	Busperse 215 - 0,02
Teste 10	4	200	0,3	C1 - 0,6	Busperse 215 - 0,02
Teste 11	4	200	0,3	B2 - 0,07	Busperse 215 - 0,02
Teste 12	4	200	0,3	B1 - 0,03	Busperse 215 - 0,02

As formulações químicas foram baseadas em processos industriais e as formulações co-enzimáticas a partir da indicação dos fabricantes, com relação ao percentual de enzimas aplicadas. As condições operacionais dos fulões foram constantes em todos os processos de remolho, com rotação de 20 rpm e temperatura de 28 °C.

Após a realização dos testes, peles e banhos foram coletados e armazenados separadamente (sob refrigeração) até o momento das análises, por um período máximo de 15 dias para algumas análises, como COT e Proteína Solúvel.

3.4.2. Depilação/Caleiro

Nesta etapa, verificou-se a influência da quantidade e do tipo de enzima no processo de depilação da pele. O tempo total de processamento foi fixado em 16 horas e 15 minutos para todos os testes. Os insumos foram dosados no decorrer das primeiras 4 horas e 15 minutos, a temperatura e rotação foram mantidas em 28°C e 20 RPM, respectivamente. As 12 horas seguintes de processamento utilizaram rotação de 10 rpm e a temperatura citada anteriormente.

Para a realização dos testes foi necessário fazer a etapa de remolho, anterior a este processo. Com esta finalidade utilizou-se a formulação do teste 3 da Tabela 9 para remolhar a pele para todos os testes de depilação/caleiro realizados. Deste modo, garantiu-se que as diferenças apresentadas nestes testes (quando comparados os diferentes tipos de processo) devem-se apenas a esta etapa de depilação/caleiro.

Na Tabela 10 são apresentadas as formulações de depilação/caleiro estudadas. A formulação 1 é uma formulação convencional utilizada pela indústria. A formulação 2 apresenta teores de insumos reduzidos e concentração do banho, com menor volume de água. As formulações 3 e 4 utilizam as enzimas C4 (lipase) e C2 (enzima para caleiro), onde a diferença entre os processos está relacionada ao percentual de enzimas aplicado, que é o dobro para o processo 4, quando comparado ao teste 3. Os testes 5 e 6 utilizam as enzimas B1(lipase) e B2 (protease), onde, também neste caso, o teste 6 apresenta percentual dobrado com relação ao teste 5.

Tabela 10: Formulações utilizadas na depilação/caleiro

Tempo de Processo (horas)	Insumos	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4	Teste 5	Teste 6
		Quím. Conv.	Quím. Red.	Enz C	Enz C	Enz B	Enz B
Tipo e Percentual (%)							
1	Água	50	40	40	40	40	40
	Ca(OH) ₂	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	Molescal LND	0,6	0,6	0	0	0	0
	Tensoativo	Eusapon LDE - 0,08	Eusapon LDE - 0,08	Busperse 215 - 0,08	Busperse 215 - 0,08	Busperse 215 - 0,08	Busperse 215 - 0,08
	Enzima	0	0	C4 - 0,03 C2 - 0,15	C4 - 0,06 C2 - 0,30	B1 - 0,04 B2 - 0,06	B1 - 0,08 B2 - 0,12
0,75	Na ₂ S	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	Ca(OH) ₂	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
1	Na ₂ S	1,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	Ca(OH) ₂	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
1,5	Água	150	50	50	50	50	50
	Ca(OH) ₂	2	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
	Tensoativo	Eusapon LDE - 0,02	Eusapon LDE - 0,02	Busperse 215 - 0,02	Busperse 215 - 0,02	Busperse 215 - 0,02	Busperse 215 - 0,02
	Enzima	0	0	C2 - 0,05	C2 - 0,1	B2 - 0,04	B2 - 0,08

Nos testes 3 e 5, as enzimas foram aplicadas seguindo-se as recomendações do fabricante. Já os testes 4 e 6, como citado anteriormente, utilizaram o dobro do percentual anterior, dos testes 3 e 5, respectivamente.

3.4.3. Desencalagem

Embora a etapa de desencalagem não fosse objeto de estudo deste trabalho, uma vez que não se utilizam enzimas nesta etapa, ela também foi realizada, para que a etapa seguinte, a purga, pudesse ser estudada.

Esta etapa, no entanto, foi problemática, pois no curtume de onde veio a formulação utilizada, após o caleiro, a pele passa pelo processo de descarte e

divisão. Neste caso, não foi possível realizar tal etapa, uma vez que não existem equipamentos no laboratório capazes de dividir peles tão pequenas.

Logo, a formulação apresentada na Tabela 11 não foi capaz de desencalar totalmente as peles, uma vez que a espessura da mesma era maior, dificultando o processo de difusão dos agentes desencalantes na pele.

Tabela 11: Formulação de desencalagem (para peles divididas)

Tempo de processo (min.)	Insumos	Percentual (%)	Observação
15	Água	200	esgotar o fulão
20	Água	200	esgotar o fulão
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,3	
	Eusapon LDE	0,02	
40	Água	200	medir pH
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,3	
	Busperse 215	0,1	
	Decaltal ESN	1,2	

Na desencalagem realizada, o tempo foi dobrado e a quantidade de reagentes utilizada foi praticamente triplicada, com relação aos dados apresentados na Tabela 11. A temperatura do banho de aquecimento dos fulões foi acertada em 28 °C e a rotação em 20 rpm. Fitas para medir pH foram utilizadas nos banhos de desencalagem. Para as peles foi utilizado indicador fenolftaleína em cortes feitos na pele, como indica a Figura 21.

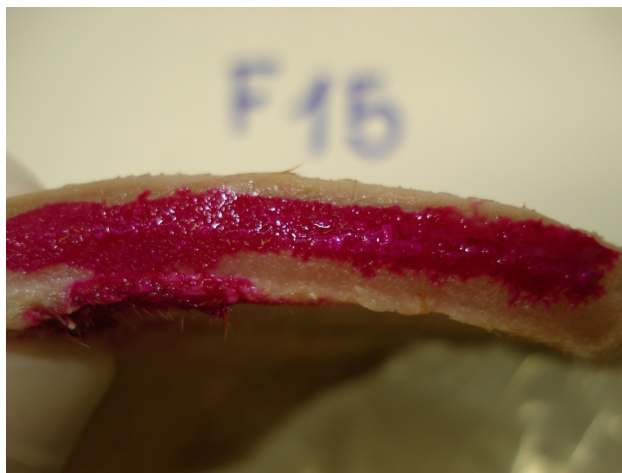


Figura 21: Uso de fenolftaleína na etapa de desencalagem.

O objetivo de se conferir o pH na seção transversal da pele foi verificar se a remoção de cálcio é efetivada ao longo de toda sua espessura.

3.4.4. Purga

Para a realização da purga de peles, industrialmente, deve-se passar primeiramente pelas etapas de bater sal, pré-remolho, pré-descarne, remolho, depilação/caleiro, descarne e desencalagem. Em escala laboratorial, estando a pele salgada e previamente descarnada, as etapas que antecedem a purga são: remolho, depilação/caleiro e desencalagem.

Foram utilizadas as formulações do teste 3 de remolho (apresentada na Tabela 9), do teste 1 de depilação/caleiro (Tabela 10) e da Tabela 11, para a desencalagem, em todos os teste de purga. O processo de purga foi iniciado após a desencalagem das peles, aproximadamente 24 horas do início do remolho.

É importante salientar que a etapa final da desencalagem e a purga ocorreram simultaneamente, pois, quando se adicionaram os produtos da formulação de purga (enzima e tensoativo) aos fulões, além da pele, os mesmos continham água (200%), sulfato de amônio (0,3%), auxiliar de desencalagem (1,2%) e tensoativo (0,1%), por mais de 40 minutos de processo.

Na purga foram testadas três diferentes formulações (onde cada uma destas utilizou uma enzima de um fornecedor distinto), em seis testes, pois cada formulação utilizou dois tempos de processamento, como pode ser visto na Tabela 12. Nesta etapa utilizou-se temperatura de 36°C e rotação de 20 rpm.

Os testes 1 e 2 utilizaram a enzima A1, os testes 3 e 4 utilizaram a enzima B3 e os testes 5 e 6 utilizaram a enzima C3. Com relação ao tempo de processamento, usualmente a indústria utiliza períodos em torno de 30 minutos, porque se acredita que longos períodos de exposição de peles às enzimas podem causar danos à estrutura das fibras colagênicas e à superfície da flor com seu desenho granular. No entanto, neste trabalho, além do tempo de 30 minutos, para fins de estudo, o tempo foi extrapolado para cada uma das enzimas testadas, como demonstram os testes 2, 4 e 6, que tiveram a duração de 3 horas, com o objetivo de testar a ação enzimática em longos períodos de contato com a pele.

Tabela 12: Formulações utilizadas na purga

	Tempo de processo (horas)	Água	Tipo e percentual de Enzima	Nome e percentual do tensoativo empregado
			Percentuais mássicos aplicados (%)	
Teste 1	0,5	200	A1 - 0,06	Busperse 215 - 0,08
Teste 2	3	200	A1 - 0,06	Busperse 215 - 0,08
Teste 3	0,5	200	B3 - 0,06	Busperse 215 - 0,08
Teste 4	3	200	B3 - 0,06	Busperse 215 - 0,08
Teste 5	0,5	200	C3 - 0,06	Busperse 215 - 0,08
Teste 6	3	200	C3 - 0,06	Busperse 215 - 0,08

3.5. Métodos Analíticos

Os 24 testes (12 de remolho, 6 de depilação/caleiro e 6 de purga) com as formulações descritas anteriormente tiveram coletas de banhos e peles para analisar de acordo com os ensaios apresentados na Tabela 13. As normas que descrevem cada um destes métodos estão dispostas nos anexos, ao final deste trabalho.

Para todos os 24 experimentos foram feitas análises de Carbono Orgânico Total (COT) e Proteína Solúvel, nos efluentes dos banhos. Estes ensaios foram realizados com o intuito de quantificar e comparar o percentual de matéria orgânica removido em cada teste.

Nos banhos de remolho, as análises de cloretos foram realizadas com o intuito de verificar se as enzimas influenciam na abertura das fibras a ponto de remover um maior percentual do sal absorvido pelas peles no processo de salga. Os sólidos dissolvidos totais remetem a pequenas moléculas orgânicas, sujeiras presentes na pele, sais dissolvidos no banho, entre outros. O nitrogênio NTK é outra forma de quantificar a matéria orgânica (com exceção a lipídeos, que não possuem nitrogênio em sua composição).

Tabela 13: Relação das análises realizadas após os testes

Análise	Norma/metodologia	Etapa Analisada	Fase Analisada
Teor de Cloretos em Banhos	NBR - 13337/1995	Remolho	Efluente
Teor de Sólidos Totais, Fixos e Voláteis	NBR - 14550/2000	Remolho	Efluente
Percentual de Matéria Volátil	NBR - 8290/1983	Remolho, caracterização da pele	Pele
Substâncias Extraíveis com Diclorometano	NBR - 11030/1997	Remolho, caracterização da pele	Pele
Nitrogênio e Substâncias Dérmicas em Peles	ASTM - D2868/2007	Caracterização da pele	Pele
Microscopia Eletrônica de Varredura	-	Depilação/caleiro	Pele
Teor de Carbono Orgânico Total	-	Remolho, depilação/caleiro e purga	Efluente
Teor de proteínas solúveis	Método de Lowry	Remolho, depilação/caleiro e purga	Efluente

Nas peles remolhadas foram analisados o teor matéria volátil (umidade), para avaliar o grau de umedecimento e abertura das fibras, e de gorduras (substâncias extraíveis com diclorometano), com a finalidade de verificar qual enzima atua melhor na remoção deste tipo de substância orgânica.

Na etapa de caleiro, além das análises comuns a todas as outras etapas, foram feitas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), em peles retiradas no decorrer do processo, cujo objetivo era verificar a remoção dos pêlos e abertura da estrutura ao longo do processo e compará-las quanto a sua eficácia, entre os diversos testes realizados.

Na purga, foram feitas análises de nitrogênio amoniacal nos efluentes, também com o objetivo de verificar a hidrólise de proteínas da pele.

As análises de MEV e de COT foram realizadas em equipamentos específicos, onde não foram encontradas normas específicas para realização destes ensaios.

As análises de MEV foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da

Universidade (CME/UFRGS). Em um aparelho da marca JEOL, modelo JSM 6060, exibido na Figura 22.

O preparo das amostras seguiu o protocolo elaborado pelo CME, onde as mesmas foram cortadas em um tamanho aproximado de 1 cm², desidratadas em banhos sucessivos de acetona (dimetilcetona), com concentração de 30, 70 e 100% de acetona (em volume) e armazenadas em dessecador até o momento das análises.

A Figura 23 apresenta uma das amostras desidratadas, montada sobre um “*stub*” (base suporte) antes da metalização (a) e outra amostra metalizada (b), pronta para ser analisada.

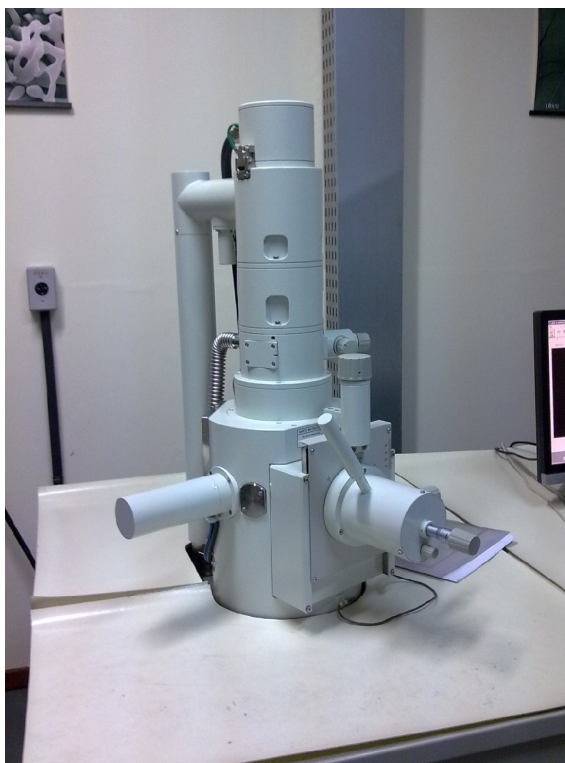


Figura 22: Fotografia do microscópio eletrônico de varredura utilizado.

As análises de COT foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Engenharia Química, no Analisador de Carbono Orgânico Total, marca Shimadzu, modelo V CSH.

Para a realização das análises, o pH das amostras foi conferido e as

amostras foram previamente filtradas, utilizando-se vácuo quando necessário. O método do equipamento selecionado no equipamento para as análises foi o TC ALTA 1000 ppm, indicado para amostras com grande concentração de carbono. A diluição inicial do equipamento foi de 5 vezes e não foi feita diluição manual.

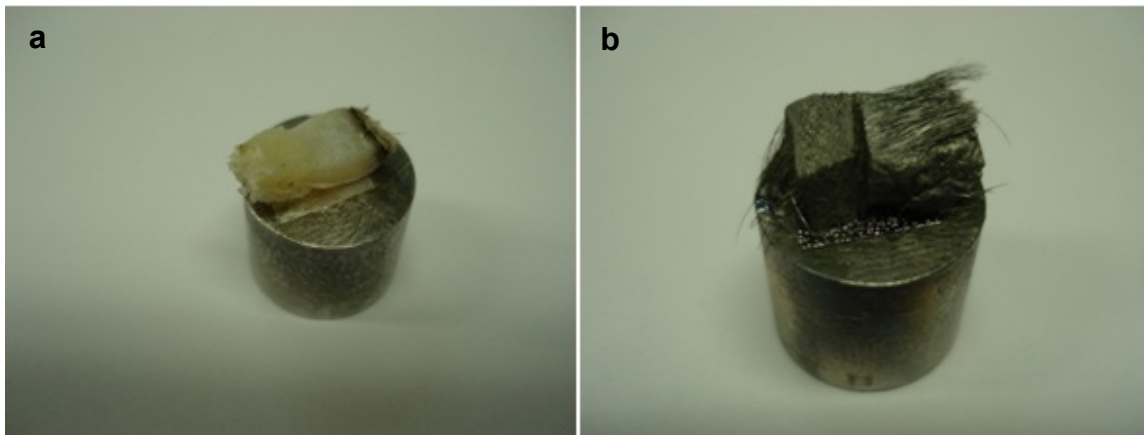


Figura 23: Preparação de amostras para as análises de MEV. (a) amostra de pele desidratada; (b) amostra de pele metalizada

A Figura 24 demonstra o equipamento utilizado nas análises de COT.



Figura 24: Equipamento de análises de Carbono Orgânico Total utilizado nos experimentos

3.6. Caracterização Enzimática

Após a realização dos testes e das análises, algumas enzimas foram escolhidas para que suas atividades frente a lipídeos e colágenos fossem determinadas. Nesta linha de caracterização de atividade enzimática, outros trabalhos estão sendo desenvolvidos pelo grupo de pesquisa (DETTMER *et al.*, 2010).

As enzimas de purga B3, A1 e C3 tiveram sua atividade colagênica medida, de acordo com uma metodologia encontrada no site da Sigma-Aldrich (http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Enzyme_Assay/collagenfalgpasub.Par.0001.File.tmp/collagenfalgpasub.pdf). Estas mesmas enzimas, juntamente com a lipase B1, também tiveram sua atividade lipídica medida. Para a realização das análises de lipases foi utilizada a metodologia desenvolvida no trabalho de Volpato (2009), com base no trabalho de Winkler e Stuckmann (1979). Os procedimentos utilizados para a realização destes testes (atividade colagênica e lipídica) encontram-se descritos no anexo.

Resultados e Discussão

Este capítulo destina-se à apresentação e discussão dos resultados experimentais obtidos neste trabalho. Primeiramente, são apresentados os resultados de caracterização da pele utilizada nos experimentos. Logo após são apresentados os resultados e a discussão para os testes de remolho, depilação e caleiro e purga dos processos químicos e coenzimáticos testados, nesta seqüência. Por fim, são apresentados os resultados relacionados à determinação da atividade enzimática de algumas das enzimas utilizadas no trabalho, com relação a colágeno e a lipídeos.

4.1. Caracterização da Pele Utilizada

Conforme foi mencionado no capítulo anterior, a pele utilizada foi caracterizada com relação ao teor de substâncias extraíveis com diclorometano (gorduras), teor de matéria volátil (água) e teor de nitrogênio e substância dérmica em peles.

A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos nessas análises com seus respectivos desvios padrão. Foram feitos seis testes utilizando-se a norma ASTM D 2868/2007, para determinação do percentual de nitrogênio, nitrogênio em base seca e substância dérmica (proteínas fibrosas) em peles. O percentual de gordura foi determinado por meio da norma NBR 11030/1997 da ABNT em seis testes. A análise de matéria volátil utilizou-se do procedimento ABNT, NBR 8290/1983 realizado em quadruplicata.

Tabela 14: Resultados obtidos para a caracterização da pele salgada antes do seu processamento

Teste	Valor Médio	Desvio Padrão
Percentual de Nitrogênio	7,721	0,431
Percentual de Nitrogênio (base seca)	14,385	0,804
Percentual de Substância Dérmica	80,844	4,517
Percentual de Água	46,328	0,231
Percentual de Gordura	1,384	0,1357

Estes dados servem como parâmetro de comparação para os testes de remolho, onde foram realizadas análises de matéria volátil e de substâncias extraíveis com diclorometano.

4.2. Testes de Remolho

Uma dificuldade encontrada neste trabalho experimental esteve relacionada à análise dos resultados, pois as variáveis de resposta utilizadas para quantificar a ação das enzimas nos testes feitos não eram sensíveis o suficiente para detectar as mudanças que ocorriam entre cada teste.

Várias das análises feitas apresentaram grande variabilidade entre as suas triplicatas, logo, diversas vezes, o intervalo de confiança calculado para o ensaio não permitiu, que fossem feitas afirmações com respeito às diferenças encontradas entre os testes realizados.

Os resultados encontrados nos ensaios foram sumarizados nos gráficos seguintes, com o auxílio do programa Minitab® (versão 15), que apresenta os valores médios encontrados para cada análise (uma vez que estes foram realizados em triplicata) juntamente com o intervalo de confiança que foi padronizado em 95%. Os gráficos relacionados aos ensaios de COT foram os únicos que não apresentaram seu intervalo de confiança. Isto porque as análises de COT apresentaram apenas os resultados médios dos testes. No entanto, como mencionado no capítulo anterior, o desvio padrão das amostras era de no máximo 2% para o COT.

Devido a busca por uma variável de resposta adequada, a etapa de remolho, que foi a primeira a ser realizada, teve uma maior quantidade de análises feitas. As análises realizadas nos testes de remolho foram apresentadas na Tabela 13 do capítulo anterior.

A Figura 25 apresenta o primeiro dos ensaios realizados, utilizado para determinar o percentual de matéria volátil em peles.

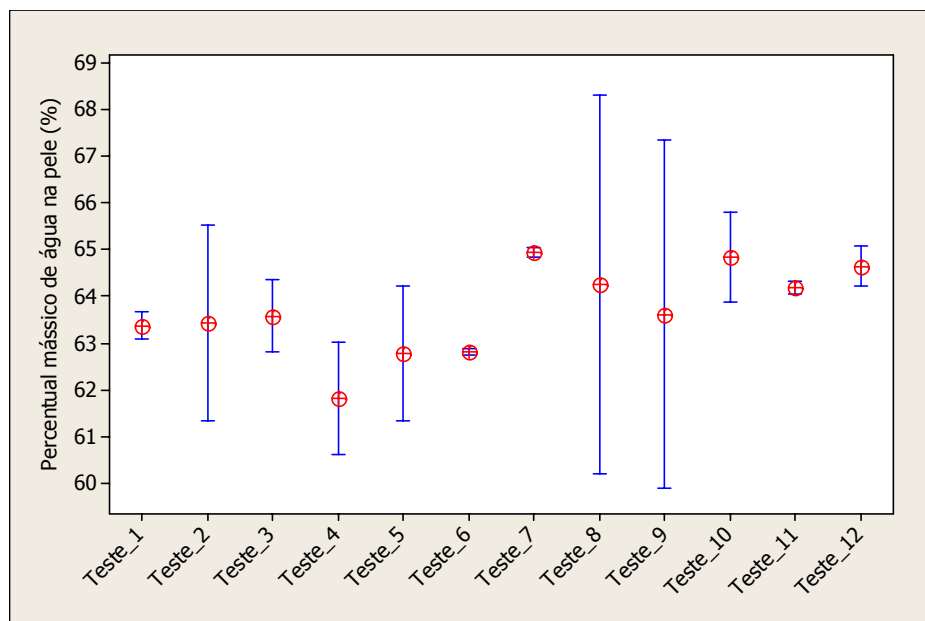


Figura 25: Percentual de Matéria volátil nas peles para os testes de remolho

O objetivo deste teste seria determinar a quantidade de água absorvida pela pele, uma vez que este parâmetro está relacionado com a reidratação da pele e abertura das fibras de colágeno após o processo de desidratação causado pelo sal de conservação.

No entanto, como foi afirmado anteriormente, este é um dos casos onde o resultado das análises não leva a muitas conclusões, em função do amplo intervalo de confiança, principalmente com relação aos testes 2, 8 e 9.

A própria metodologia, neste caso, contribui com a alta variabilidade dos resultados, uma vez que as peles utilizadas devem ser cortadas em pequenos pedaços de aproximadamente 25 mm², acarretando na perda de água da amostra devido à pressão exercida pela lâmina no momento do corte.

De acordo com este ensaio, ao final dos testes de remolho, independentemente do tempo, o teor de umidade na pele subiu de 46%, de acordo com a Tabela 14, para aproximadamente 63%. Este percentual está associado ao conteúdo de água ligado de forma mais concisa ao colágeno, uma vez que parte da água absorvida pela pele foi removida através da pressão exercida no momento de preparação das amostras para as análises.

A Figura 26 demonstra o resultado da segunda análise realizada. O ensaio para determinação do teor de cloretos em banhos apresentou uma variabilidade menor, quando comparado ao ensaio anterior.

Por meio desta análise também é possível identificar a quantidade de água absorvida pela pele, pois, à medida que a pele se reidrata, o cloreto absorvido por ela na etapa de salga é liberado ao banho.

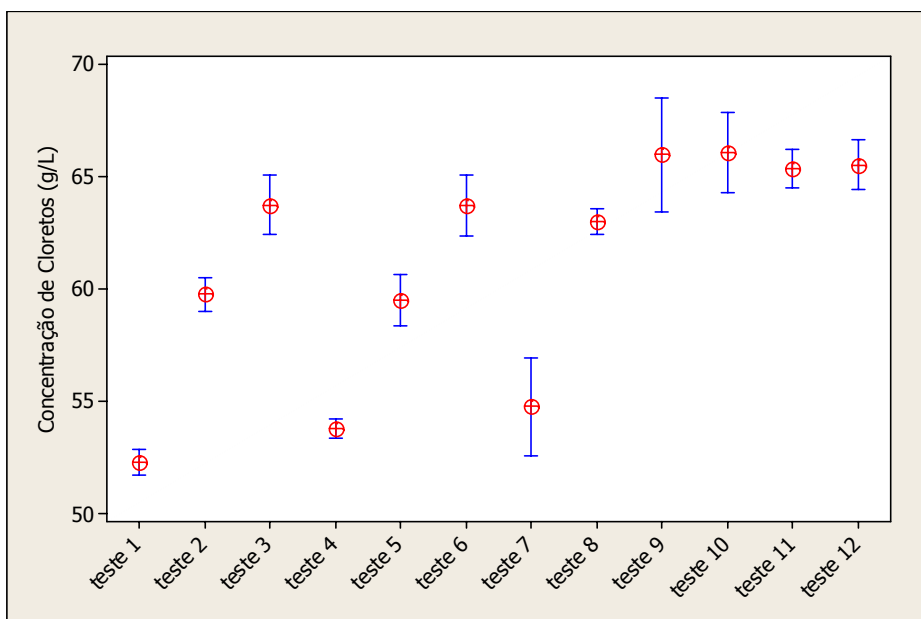


Figura 26: Concentração de cloretos em banho para os testes de remolho

Nesta análise, pode-se identificar a importância da variável tempo de processamento. Quando se comparam os valores obtidos para os testes 1, 4 e 7 (1 hora de processamento) aos valores dos testes 2, 5 e 8 (2 horas de processamento) e também dos testes 3, 6, 9, 10, 11 e 12 (4 horas de processamento), observa-se claramente três faixas de valores. Ainda é possível concluir que o tipo de processo

(químico ou coenzimático) não possui grande influência na liberação de cloretos no banho, uma vez que, para o tempo máximo o valor cresce de 63 g/l, no processo químico para 65 g/l. Por fim, a utilização da concentração em dobro das enzimas C1 (teste 10) não se demonstrou vantajosa, no entanto, a utilização das enzimas B1 e B2 separadamente (teste 12 e 11, respectivamente) levaram a resultados levemente superiores quando comparadas ao teste 6, embora estatisticamente não se possa fazer tal afirmação.

As Figuras 27, 28 e 29 estão relacionadas com a determinação do teor de sólidos totais, fixos e voláteis em banho. Esta análise quantifica o teor de substâncias liberadas da pele para o banho, sendo os voláteis considerados de origem orgânica e os fixos de origem inorgânica (como cloreto, por exemplo). Os sólidos totais constituem a soma dessas duas parcelas e estão ilustrados na Figura 27.

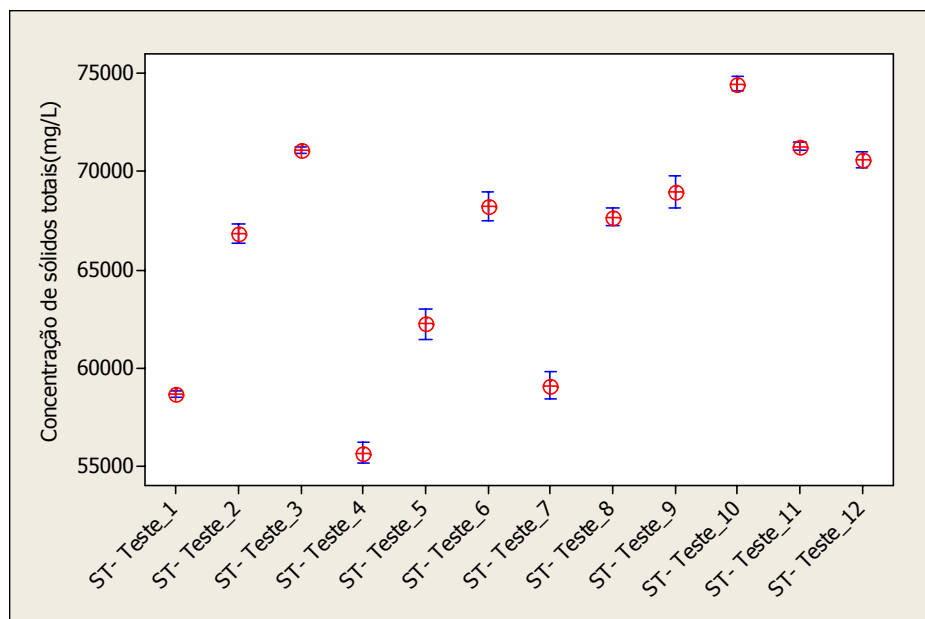


Figura 27: Concentração de Sólidos totais (ST) em banho para os testes de remolho

Os resultados verificados na Figura 28 são um reflexo da Figura 26, uma vez que os valores de concentração de sólidos fixos (material de origem inorgânica) são um pouco superiores aos valores de teor de cloretos.

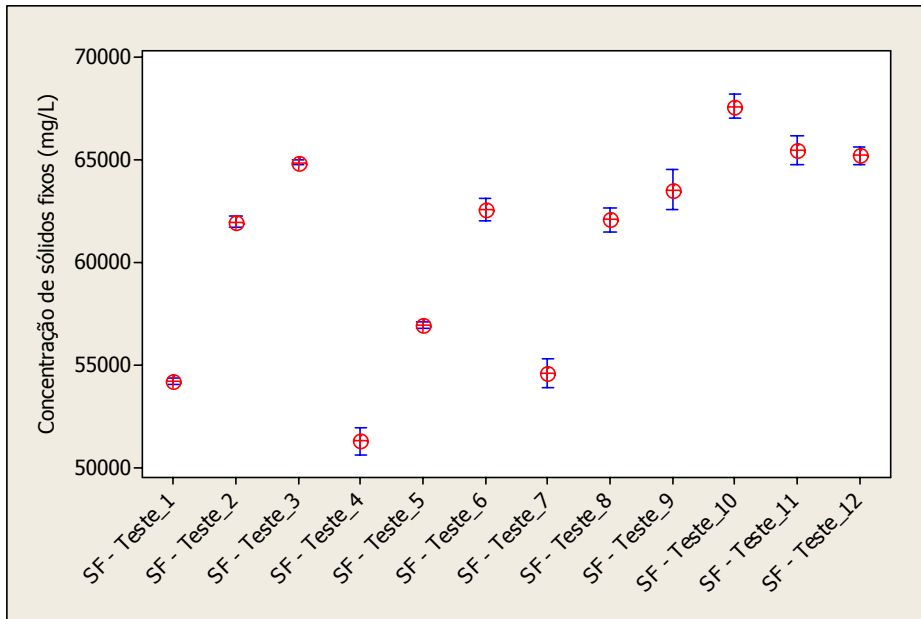


Figura 28: Concentração de Sólidos fixos (SF) em banho para os testes de remolho

A Figura 29 apresenta os resultados do teor de sólidos voláteis. Esta quantidade está relacionada à liberação de matéria orgânica, como proteoglicanos, proteínas fibrosas, proteínas não fibrosas (como sangue) e gorduras provenientes da pele.

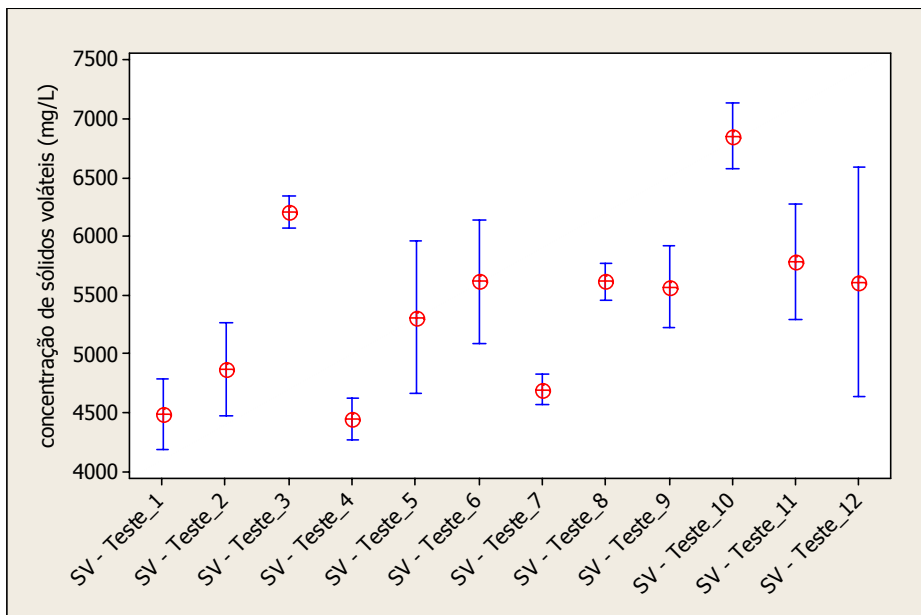


Figura 29: Concentração de Sólidos voláteis (SV) em banho para os testes de remolho

É possível observar, no caso da Figura 29, que a amplitude do intervalo de

confiança para os testes é maior em relação às figuras 27 e 28. Isso se deve ao fato de que parte da proteína liberada pela pele estava em suspensão no banho e pode ter passado através da peneira utilizada para retenção de sólidos. Ainda de acordo com esta figura, o processo químico é mais eficiente em termos de remoção de matéria orgânica (podendo esta ser relacionada com a matéria volátil) que o processo coenzimático, que utilizou as enzimas B. Apenas no teste 10 foi verificado resultado superior a este (teste 3), no entanto, devido aos problemas mencionados na filtração da amostra esta análise não se demonstrou válida para propósitos de comparação entre as tecnologias, uma vez que havia presença de material sólido suspenso nesta análise.

Por fim, a Figura 30 demonstra a compilação dos três gráficos anteriores. Nesta figura é possível observar o que foi mencionado anteriormente (a soma do teor de sólidos fixos e voláteis corresponde aos sólidos totais), além da influência progressiva do tempo no efeito de remolho.

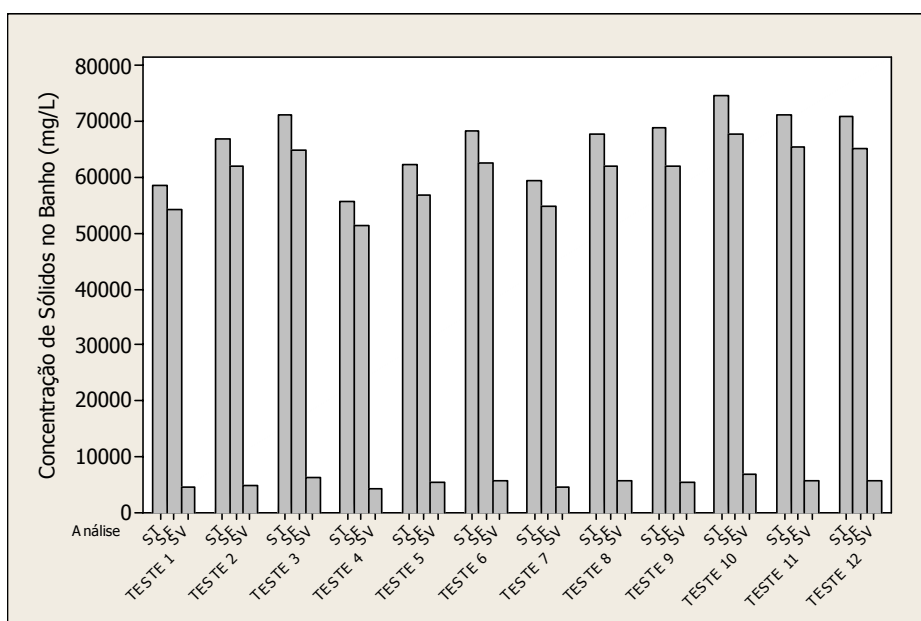


Figura 30: Perfis das análises de ST, SF e SV em banho para os testes de remolho

A Figura 31 ilustra os resultados obtidos nos testes de substâncias extraíveis com diclorometano realizados nas peles. Logo, neste caso, quanto maior foi o percentual de gorduras encontrado no teste, menor a quantidade de lipídeos removidas da pele, resultando em um processo menos eficiente.

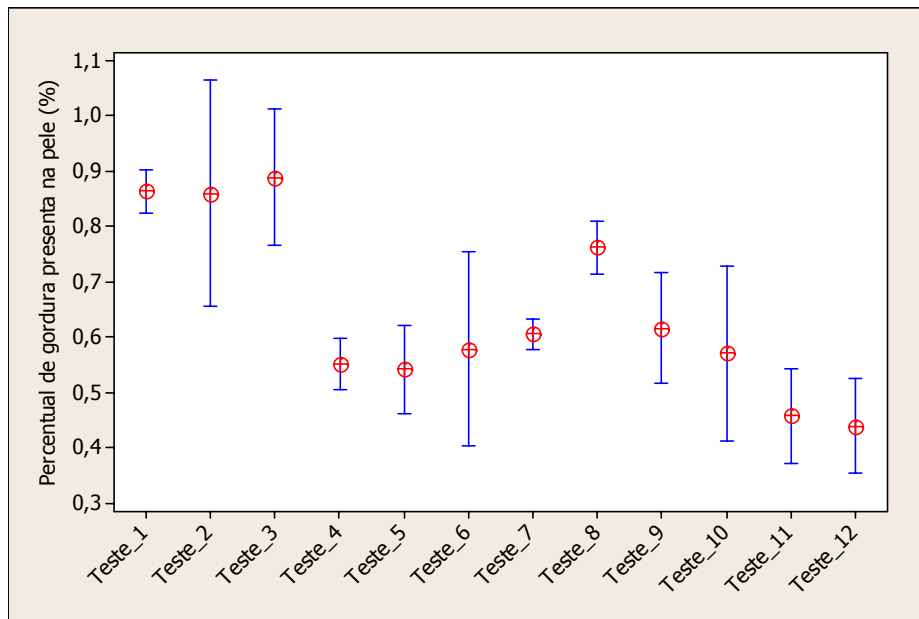


Figura 31: Percentual de substâncias extraíveis com diclorometano em peles para os testes de remolho

A amplitude do intervalo de confiança também é alta neste caso. No entanto, é possível afirmar que o processo químico tem uma capacidade menor na remoção de gorduras, quando comparado aos processos coenzimáticos. Ainda, de acordo com esta análise, o tempo, tipo de enzima e percentual de aplicação não possuem influência na remoção de gorduras. Comparando-se os dados da Tabela 14 com os percentuais de gordura remanescentes (média entre os testes 1 a 3) na pele, verifica-se que o processo químico remove em torno de 38,5% da gordura inicial presente na pele. Já os testes coenzimáticos 11 e 12 apresentaram um percentual de remoção de aproximadamente 67,5%, o que representa uma diferença de 29% entre a eficiência dos processos.

A falta de confiança nos resultados dos testes feitos, devido ao elevado desvio padrão de algumas amostras, muitas vezes inerente à metodologia, que se demonstrou incapaz de detectar as diferenças existentes entre os processos, levou à busca de outras análises.

Diversos trabalhos como os de Anandan *et al.* (2008), Mukhtar e Haq (2008), Ganesh Kumar *et al.* (2008), Madhumathi *et al.* (2007) e Riffel *et al.* (2003) utilizaram o método de Lowry *et al.* (1951) para determinação de proteínas solúveis com o

objetivo de quantificar diferenças entre processos químicos e coenzimáticos. Adicionalmente, análises para a determinação de COT também foram realizadas, como no trabalho de Yilmaz *et al.* (2007).

A análise de proteína solúvel requer a construção de uma curva padrão, conforme descrito na metodologia (Lowry *et al.*, 1951). Esta curva é apresentada na Figura 32, juntamente com a equação da reta obtida (Equação 18), que foi utilizada na conversão das leituras de absorbância em concentração de proteína (mg/ml).

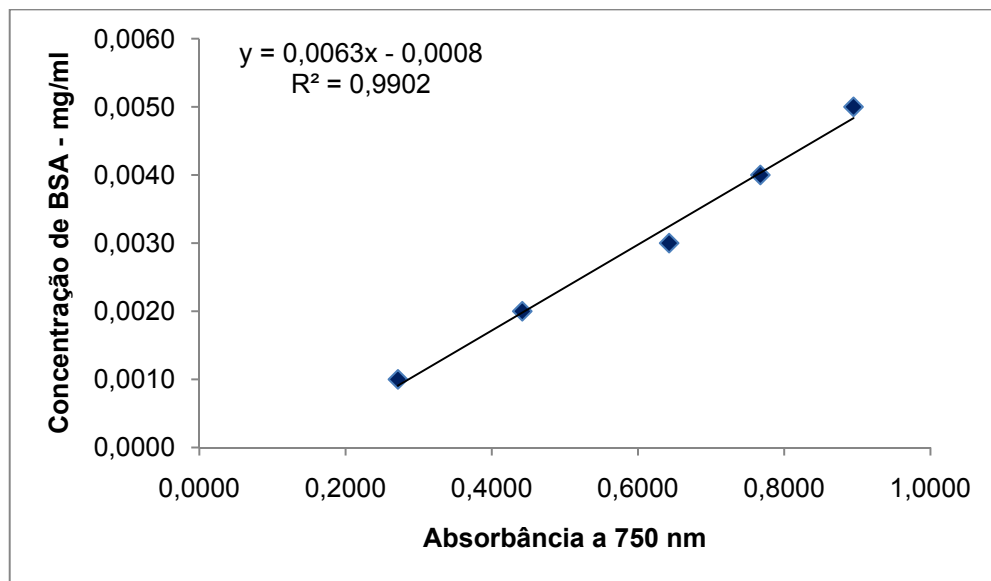


Figura 32: Curva padrão e equação da reta para os ensaios de proteína solúvel

Equação 18

$$\text{Conc. de Proteína Solúvel} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = 0,00063 * \text{Absorbância (750nm)} - 0,0008$$

Foram feitas algumas diluições manuais para adequar as leituras dos testes à faixa de aplicação da curva padrão. Para o remolho, as amostras foram diluídas cinquenta vezes (50x); para a depilação e caleiro utilizou-se diluição de sessenta vezes (60x) e para os testes de purga a diluição foi de 10 vezes (10x).

Embora os testes 4 e 5 apresentem uma amplitude elevada do seu intervalo de confiança, os demais testes apresentaram bons resultados. Assim como na Figura 29, neste caso também é possível verificar a influência do tempo na liberação de proteínas.

Os resultados desta análise encontram-se na Figura 33.

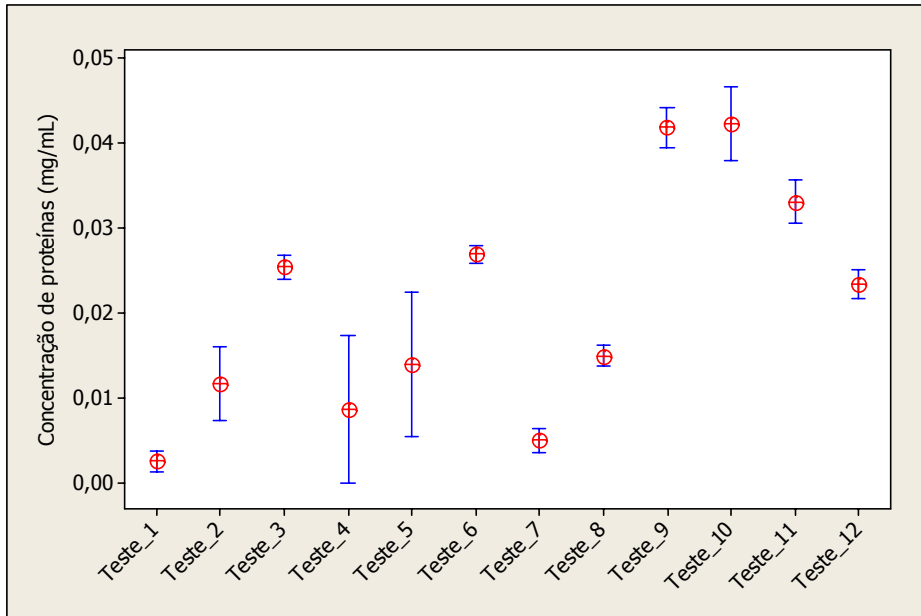


Figura 33: Proteína solúvel para os banhos dos testes de remolho

Verificou-se que os testes químicos e coenzimático (testes 1 a 8) apresentam desempenho semelhante, levando-se em consideração a variável tempo. No entanto o desempenho da enzima C1 no tempo de 4 horas (teste 8) foi muito superior em comparação aos demais testes (1 a 7 e 12). O teste 10, comparado ao teste 9, provou que a concentração de enzima estava adequada para os propósitos desejados (liberação de proteínas). Já o teste 11 indicou duas possibilidades. A primeira é de que pode haver um efeito de interação entre as enzimas B1 e B2, prejudicando o desempenho das mesmas quando utilizadas em conjunto. E a segunda, é de que a dosagem de enzima utilizada está subestimada, não sendo possível verificar a ação da enzima sob o substrato. De fato, os percentuais de aplicação das enzimas B1 e B2 (que somados atingem 0,1%) são inferiores àqueles utilizados pela enzima C1 (0,3%).

A Figura 34 apresenta os resultados das análises do teor de COT.

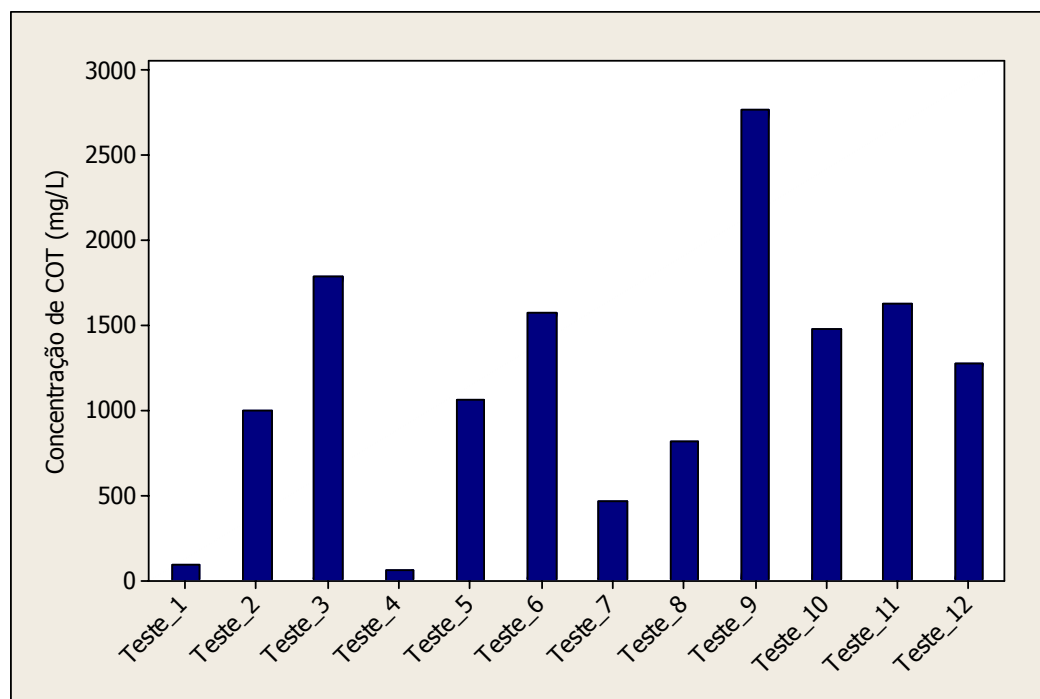


Figura 34: Concentração de Carbono Orgânico Total para os banhos dos testes de remolho

Pode-se observar neste caso, assim como no anterior, que os processos coenzimáticos que utilizam as enzimas B1 e B2 aplicadas nos testes 4 a 6 apresentam desempenho comparável aos processos químicos, ou seja, estas enzimas não atuam no substrato. Já a enzima C1 (teste 7 a 10) apresenta desempenho muito superior às demais no tempo de 4 horas. No entanto, para o dobro da concentração enzimática (teste 10), não se verifica o mesmo comportamento que foi encontrado para a Figura 33, pois neste caso verifica-se uma queda acentuada com relação à remoção de carbono orgânico da pele para o banho. Para os casos 11 e 12, observa-se, que mesmo atuando sozinhas, estas enzimas não são capazes de remover maior quantidade de matéria orgânica, chegando-se a mesma conclusão anterior.

Os resultados das análises de matéria volátil, teor de cloretos, percentual de gorduras e carbono orgânico total, bem como os desvios padrão para cada análise estão dispostos na Tabela 15. Os resultados dos demais testes, proteína solúvel, sólidos totais, fixos e voláteis encontram-se na Tabela 16.

Tabela 15: Resultados médios e desvio padrão dos ensaios realizados para os testes de remolho

Análises realizadas em peles (p) e banhos (b)							
Teste	Matéria volátil (p)		Teor de cloretos (b)		% de gorduras (p)		COT (b)
	média (%)	DP	média (g/l)	DP	média (g/l)	DP	média (mg/l)
1	63,372	0,033	52,312	0,221	52,312	0,221	1114,0
2	63,412	0,233	59,785	0,301	59,785	0,301	995,3
3	63,572	0,085	63,739	0,527	63,739	0,527	1781,0
4	61,800	0,134	53,786	0,173	53,786	0,173	1318,0
5	62,772	0,161	59,492	0,453	59,492	0,453	1055,0
6	62,820	0,008	63,687	0,552	63,687	0,552	1570,0
7	64,932	0,011	54,769	0,866	54,769	0,866	457,2
8	64,249	0,451	62,988	0,236	62,988	0,236	813,7
9	63,610	0,416	65,955	1,008	65,955	1,008	2765,0
10	64,835	0,106	66,068	0,710	66,068	0,710	1474,0
11	64,168	0,015	65,331	0,348	65,331	0,348	1275,0
12	64,639	0,049	65,501	0,445	65,501	0,445	1621,0

Tabela 16: Resultados médios e desvio padrão das análises feitas nos testes de remolho

Análises realizadas em banhos								
Teste	Sólidos Fixos		Sólidos Voláteis		Sólidos Totais		Prot. Solúvel	
	média (mg/l)	DP	média (mg/l)	DP	média (mg/l)	DP	média (mg/ml)	DP
1	54189,333	69,551	4484,000	120,466	58673,333	69,551	2,50E-03	4,84E-04
2	61974,667	107,058	4868,000	158,038	66842,667	188,694	1,17E-02	1,75E-03
3	64886,667	57,735	6205,333	56,048	71092,000	78,791	2,54E-02	5,54E-04
4	51241,333	256,042	4446,667	71,703	55688,000	199,038	8,61E-03	3,51E-03
5	56942,667	55,474	5310,667	261,085	62253,333	314,180	1,39E-02	3,43E-03
6	62618,667	221,173	5614,667	210,079	68233,333	280,637	2,69E-02	4,35E-04
7	54562,667	289,837	4697,333	52,205	59106,667	276,676	4,94E-03	5,48E-04
8	62086,667	238,976	5616,000	64,374	67702,667	174,646	1,49E-02	5,12E-04
9	63529,333	393,148	5572,000	139,485	68973,333	341,955	4,18E-02	9,58E-04
10	67616,000	233,135	6853,333	113,795	74469,333	140,987	4,22E-02	1,75E-03
11	65501,333	283,248	5788,000	197,545	71289,333	85,822	3,30E-02	1,04E-03
12	65213,333	159,516	5613,333	391,639	70604,000	174,034	2,33E-02	6,61E-04

4.3. Testes de Depilação e Caleiro

As análises realizadas nos testes de depilação e caleiro foram feitas ao final do processo, logo, o tempo de processamento das peles não foi avaliado neste caso, mas apenas o tipo de enzima aplicado e sua concentração.

Além dos ensaios de determinação do teor de carbono orgânico total e proteína solúvel, foram feitas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), para acompanhar a ação enzimática ao longo do processo.

A Figura 35 ilustra os banhos residuais dos testes de depilação e caleiro. Esta etapa apresentou maiores concentrações de matéria orgânica nos banhos em comparação com a etapa de remolho e a de purga, o que já era esperado, uma vez que nesta etapa está prevista a liberação de pêlos e epiderme.

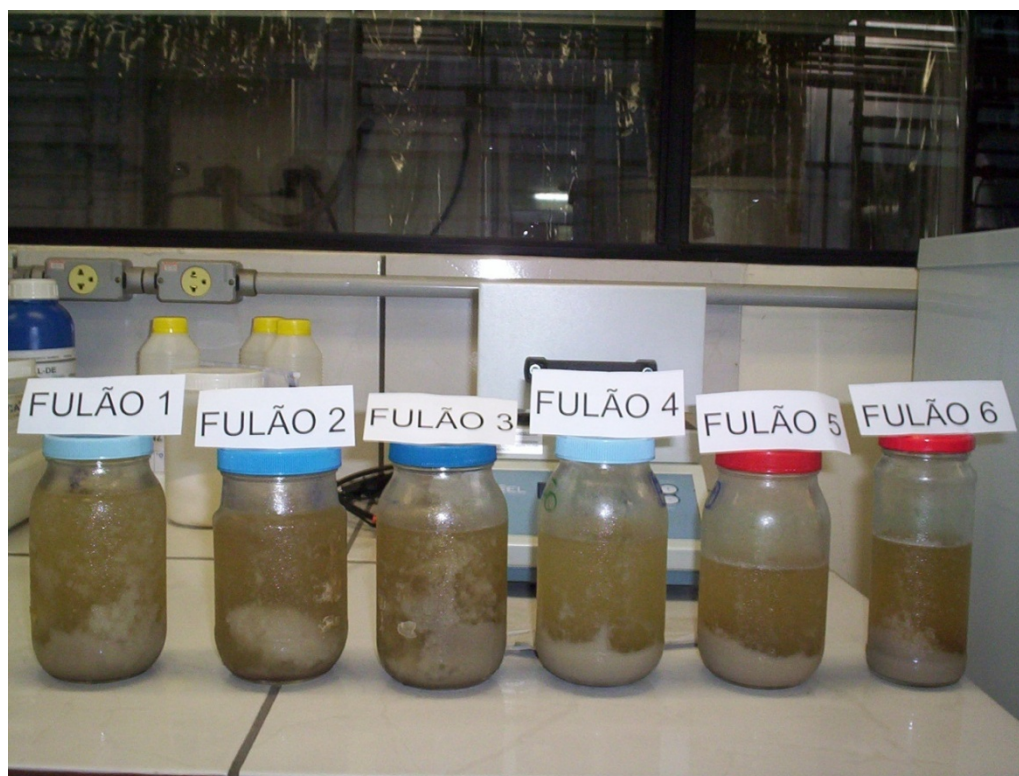


Figura 35: Banhos residuais dos testes de depilação e caleiro ao final do processo

Verifica-se neste processo uma grande quantidade de matéria orgânica em suspensão liberada, além disso, a quantidade de hidróxido de cálcio presente também colabora para a formação de precipitado, uma vez que a solubilidade deste

componente em água é baixa (aproximadamente 1,41 g/l em água a 40 °C).

A Figura 36 demonstra as peles após o processo de depilação e calceiro para os três principais processos, químico convencional (teste 1), químico com redução dos percentuais de água e insumos (teste 2) e coenzimático (teste 3).



Figura 36: Da esquerda para a direita (testes 1, 2 e 3), peles ao final do processo de depilação e calceiro

É possível observar com base nas imagens que a depilação no teste 2 foi incompleta. No teste 1 havia grande presença de pêlos nos folículos e no teste 3 a pele estava mais limpa, embora fosse verificado que existiam alguns pelos inteiros que não foram removidos, devido à ação mecânica baixa nos fulões de bancada.

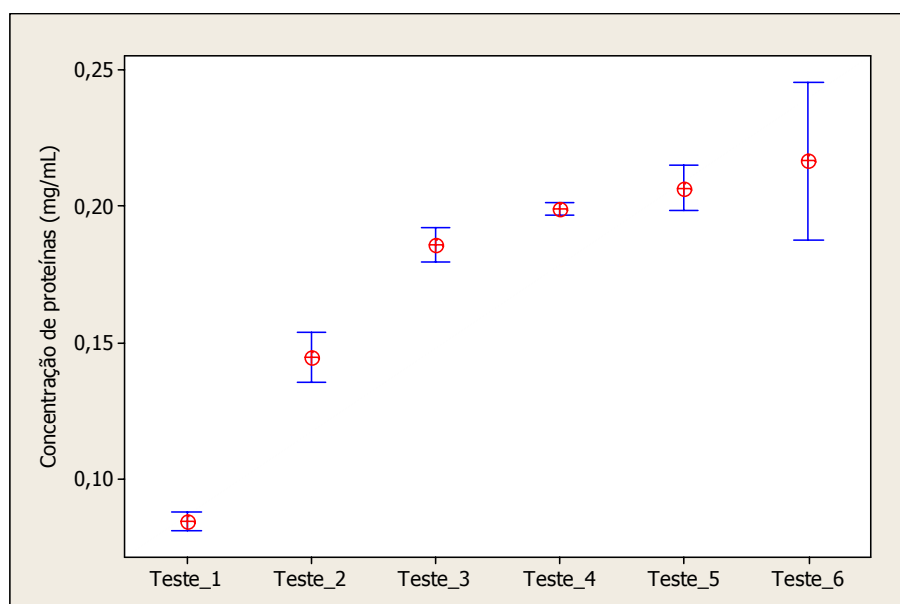


Figura 37: Análise de proteína solúvel para os banhos dos testes de depilação e calceiro.

A Figura 37 apresenta o resultado da análise de proteína solúvel nos banhos residuais de depilação e caleiro.

Observa-se nesta figura que o teste 1 aponta os menores teores de concentração de proteínas, porém, vale lembrar, que este teste (ver Tabela 10) apresenta uma formulação diferente das demais, não só pela quantidade de insumos aplicados, mas também pela quantidade de água utilizada neste processo, acarretando em uma diluição dos resultados. No entanto, para os demais resultados, observa-se um aumento na concentração de proteínas para os testes coenzimáticos (teste 3 a 6) em comparação com o teste químico 2. Com relação à concentração enzimática, não existem diferenças significativa entre os testes 5 e 6 (enzimas B1 e B2), já para os testes 3 e 4 (enzimas C), o aumento na concentração de proteínas é mínimo com relação ao aumento na concentração da enzima.

O gráfico da Figura 38 indica o mesmo comportamento obtido para o ensaio de proteína solúvel, confirmando estes resultados.

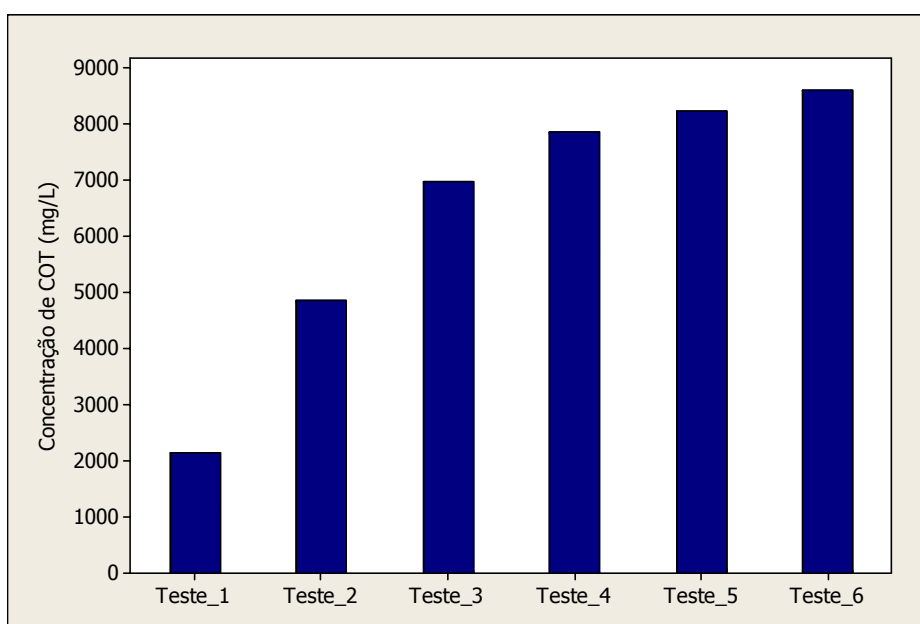


Figura 38: Análise teor de Carbono Orgânico Total para os banhos dos testes de depilação e caleiro.

A Tabela 17 sumariza os resultados dos ensaios realizados nos testes de caleiro que foram apresentados sob a forma de gráficos na Figura 37 e na Figura 38, juntamente com o desvio padrão dos ensaios de proteína solúvel. Os desvios padrão

para os testes de COT não foram demonstrados, pois conforme foi mencionado anteriormente, o equipamento que realiza a amostra limitou um desvio máximo de 2% entre as triplicatas.

Tabela 17: Resultados médios e desvio padrão dos ensaios realizados para os testes de depilação e caleiro

Teste	Análises realizadas		
	COT	Proteína Solúvel	
	média (mg/l)	média (mg/ml)	DP
1	2156	8,44E-02	1,33E-03
2	4864	1,45E-01	3,65E-03
3	6967	1,86E-01	2,50E-03
4	7871	1,99E-01	8,86E-04
5	8232	2,07E-01	3,37E-03
6	8613	2,17E-01	1,16E-02

4.3.1. Análise de MEV

Ao todo foram analisadas trinta amostras no microscópio eletrônico de varredura, gerando mais de trezentas e vinte imagens de peles desta etapa em diferentes tempos de processamento e também sob diferentes graus de magnificação.

A apresentação de todas estas imagens obtidas seria excessiva, de modo que apenas algumas imagens representativas de cada teste em cada um dos tempos de coleta, foram escolhidas para fins de comparação entre os processos químicos e coenzimáticos.

As peles foram coletadas no decorrer dos processos de depilação e caleiro e armazenadas sob refrigeração até o momento de preparação das amostras para as análises no MEV. Os resultados são apresentados em blocos, onde cada bloco de imagem representa um valor de tempo no qual a amostra foi coletada.

Os testes 1 e 2 são processos convencionais, sendo que o segundo apresenta uma formulação com percentuais de água e de aplicação de insumos reduzidos. Os testes 3 e 4 utilizam as enzimas C2 e C4 (com aplicação do dobro do percentual de enzimas no teste 4. Já os testes 5 e 6 utilizam as enzimas B1 e B2.

O primeiro bloco de imagens de MEV, Figura 39, foi gerado utilizando-se uma magnificação de 50 vezes. As amostras apresentadas são relativas à seção transversal das peles dos testes 1 a 6 (enumerados a partir da esquerda para direita e de cima para baixo). Estas peles foram retiradas do processo depois de decorrida a primeira hora do processamento de depilação e caleiro, onde haviam sido adicionados apenas tensoativos, água, hidróxido de cálcio e enzima (nos testes coenzimáticos).

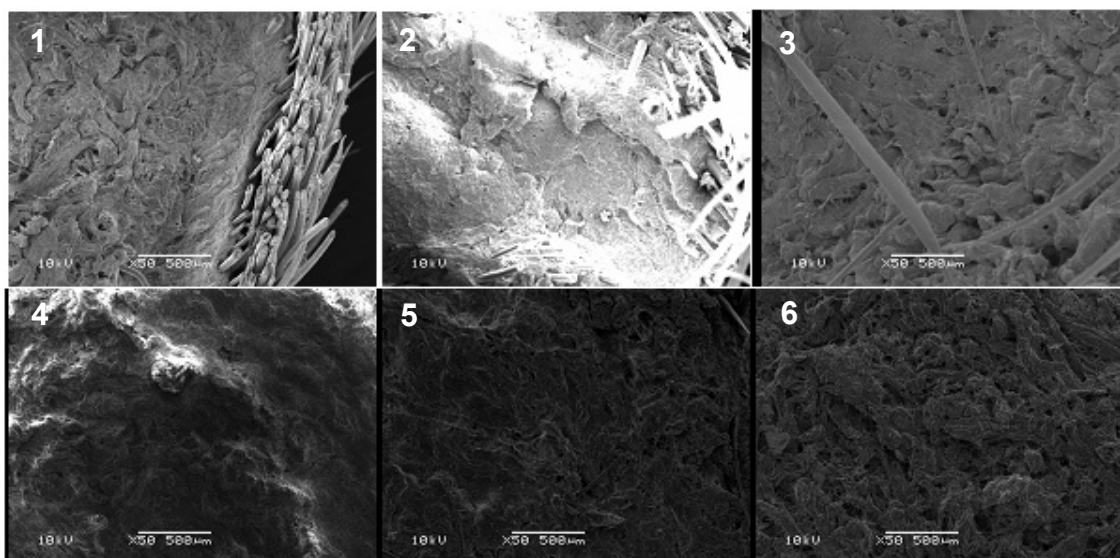


Figura 39: Imagens das amostras de pele dos testes 1 a 6, da esquerda para direita, analisadas após 1 hora do início do processo de depilação e caleiro, obtidas em MEV

Uma vez que para os testes de remolho não foram verificadas diferenças significativas entre os processos químicos e enzimáticos, após a primeira hora de processo, espera-se o mesmo para a etapa de depilação e caleiro.

O segundo bloco de imagens, Figura 40, já apresenta algumas diferenças visuais. Neste momento da etapa de processamento além dos insumos mencionados anteriormente, também foi adicionado sulfeto de sódio e hidróxido de cálcio.

É possível observar, de acordo com as imagens, que a base dos pêlos para os processos coenzimáticos começa a ficar mais solta, sendo possível observar que alguns pêlos já foram removidos. Não é possível, até o momento, identificar

diferenças entre os processos coenzimáticos, no entanto, estes se diferenciam do teste 1, que além de possuir menos pêlos, apresenta parte destes visivelmente destruído, enquanto que isto não se verifica para os testes coenzimáticos.

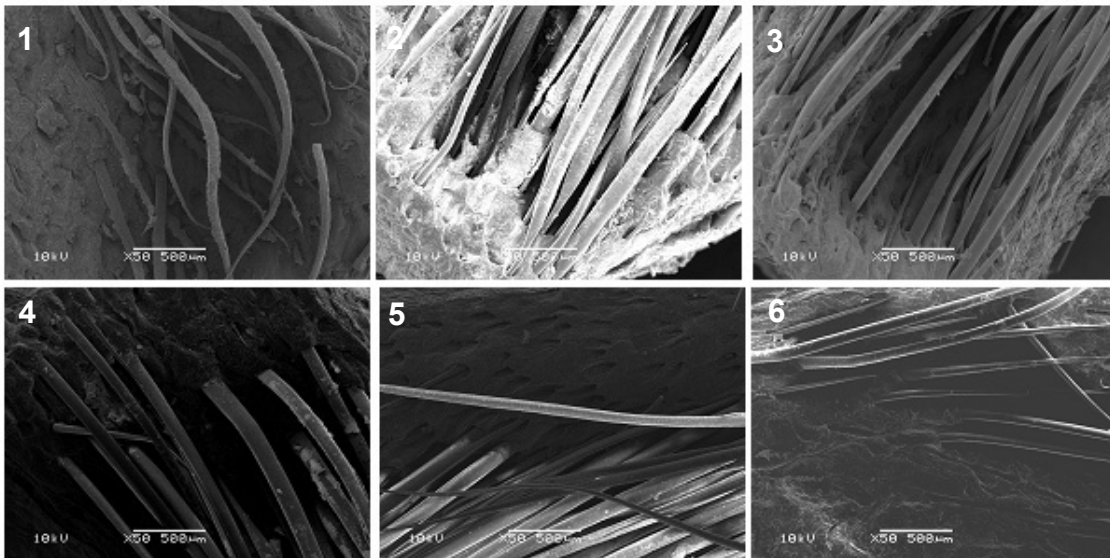


Figura 40: Imagens das amostras de pele dos testes 1 a 6, da esquerda para direita, analisadas após 1 hora e 45 minutos do início do processo de depilação e calceiro, obtidas em MEV

A Figura 41 representa o terceiro bloco de imagens do MEV, obtidos após 2 horas e 45 minutos do início do processo, correspondendo à terceira etapa de adição de hidróxido de cálcio e à segunda de sulfeto de sódio.

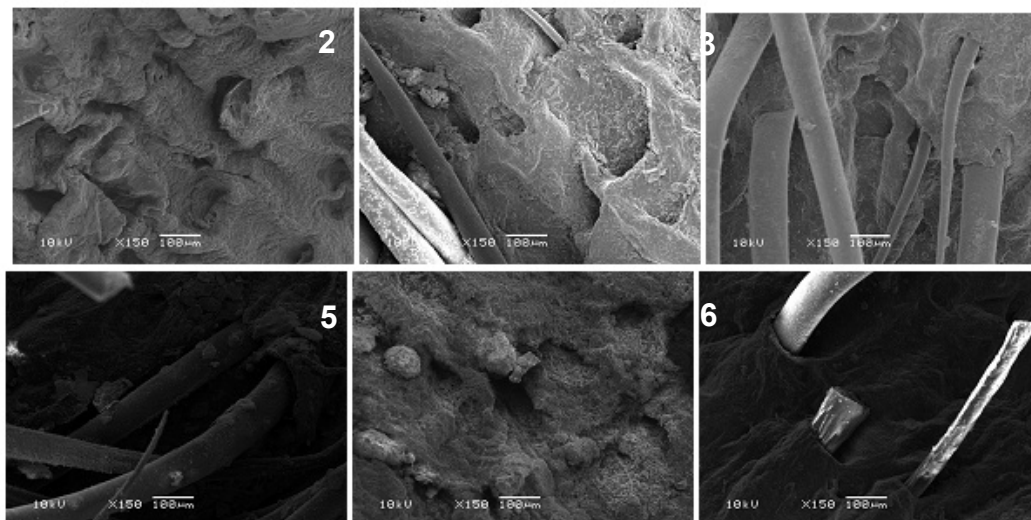


Figura 41: Imagens das amostras de pele dos testes 1 a 6, da esquerda para direita, analisadas após 2 horas e 45 minutos do início do processo de depilação e calceiro, obtidas em MEV

O efeito de inchamento, provocado pela adição do hidróxido de cálcio já está bem visível, para os testes 1 e 5. No entanto, a presença de restos de pêlos nos folículos pilosos ainda existe. Para os testes coenzimáticos, alguns pêlos ainda não foram totalmente liberados, embora o afrouxamento da estrutura da raiz esteja cada vez mais visível.

Na Figura 42, após se passarem 4 horas e 15 minutos do início do processo é possível verificar o avanço do processo de depilação.

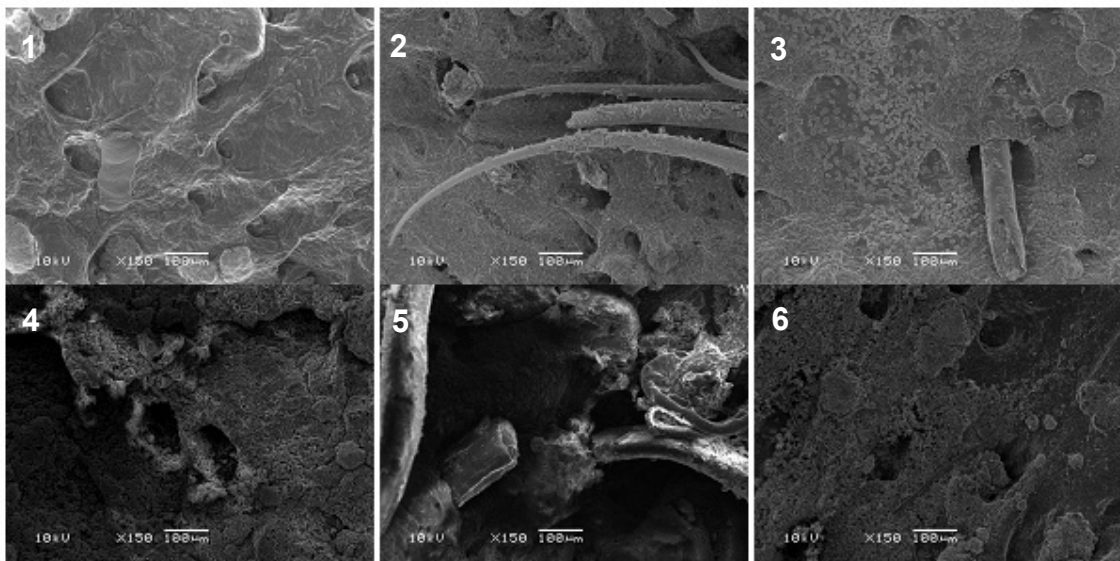


Figura 42: Imagens das amostras de pele dos testes 1 a 6, da esquerda para direita, analisadas após 4 horas e 15 minutos do início do processo de depilação e caleiro, obtidas em MEV

O processo químico praticamente já removeu toda queratina dos pêlos, restando alguns poucos folículos com raízes remanescentes. Nos processos coenzimáticos é visível a presença de alguns pêlos não removidos pelo processo.

Ao final do processo de depilação, como pode ser visto no bloco de imagens da Figura 43, o processo químico (teste 1), aparenta o melhor resultado. No entanto, observou-se que os poucos pêlos remanescentes nos testes coenzimáticos são removidos com muito mais facilidade que os restos de pêlos presos nos folículos pilosos dos testes 1 e 2. O caso do teste 2 é mais problemático, uma vez que a quantidade de sulfeto adicionada foi insuficiente para atacar toda queratina dos pêlos, restando diversos folículos com pêlos remanescentes além de diversos pêlos não atacados.

O teste 5 apresentou resultados visivelmente bons, pois a pele está limpa e livre de pêlos.

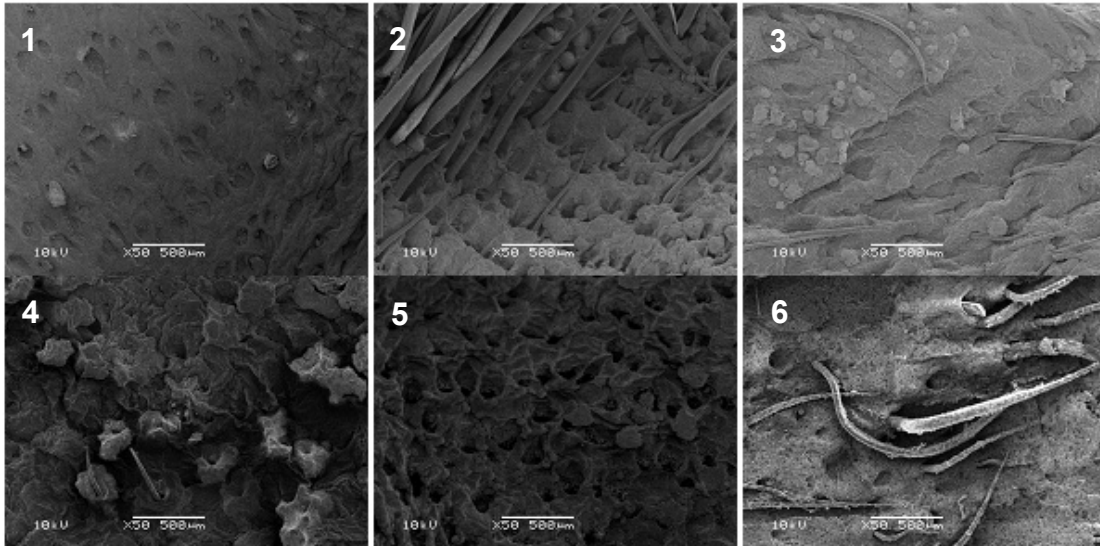


Figura 43: Imagens das amostras de pele dos testes 1 a 6, da esquerda para direita, analisadas após 16 horas e 15 minutos do início do processo de depilação e caleiro, obtidas em MEV

O teste 3, também apresentado na Figura 36, (página 82) apresentou uma boa limpeza da pele, embora seja visível a presença de pêlos mais finos.

Esta observação é bem interessante, uma vez que, para peles com pêlos mais claros, verificou-se que os processos coenzimáticos não atuaram tão bem quanto em peles de pelagem escura, permanecendo ao final do processo alguns pêlos mais jovens, como demonstra a imagem da Figura 44.



Figura 44: Imagem de uma pele ao final de um teste de caleiro coenzimático

4.4. Testes de Purga

A etapa de purga teve seus seis testes avaliados com relação ao teor de carbono orgânico total e de proteína solúvel nos banhos. Foram testadas 3 enzimas, cada uma delas com os tempos de processo de 30 minutos e também 3 h. A Figura 45 apresenta a imagem de dois banhos residuais dos testes 1 e 2 (que utilizam a enzima A1), onde é possível observar a diferença de coloração, indicativa do teor de matéria orgânica removido em cada um dos banhos. É interessante fazer uma comparação desta imagem com a imagem da Figura 35 (página 81), que apresenta os banhos residuais dos testes de caleiro. Além da grande diferença de coloração, percebe-se a presença de matéria orgânica em suspensão no caso da figura anterior, que funcionam como dois indicativos do teor elevado de material extraído das peles.

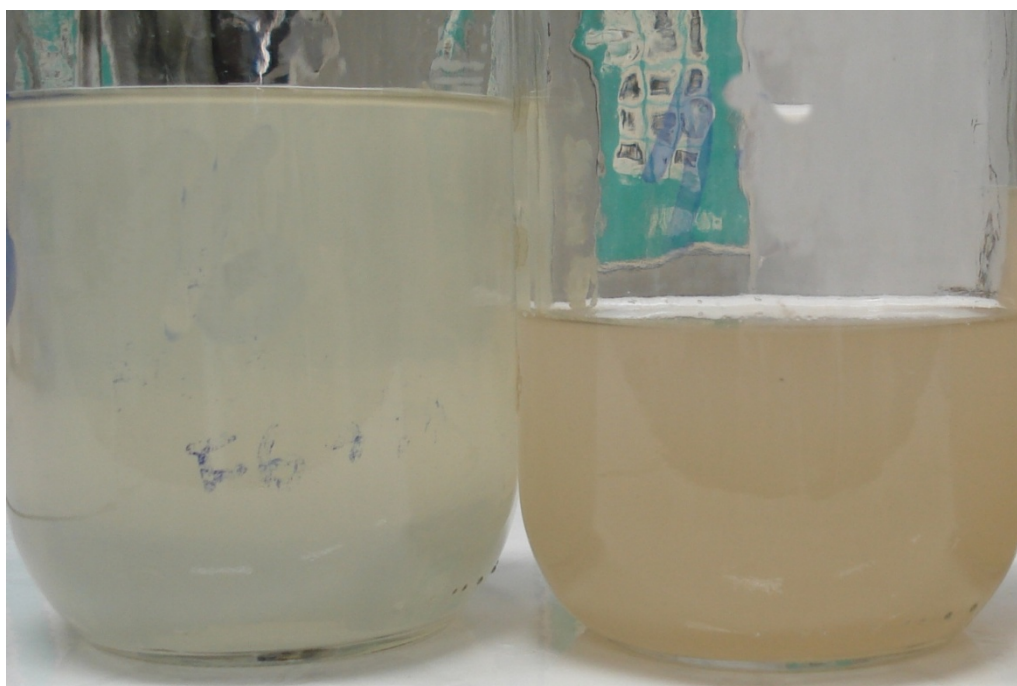


Figura 45: Banhos de purga dos Teste 1 (30 minutos), à esquerda, e Teste 2 (3 horas), à direita

A Figura 46 apresenta os resultados para os testes de proteína solúvel dos banhos residuais de purga. A curva padrão para este teste encontra-se na Figura 32 (página 77) da seção 4.2.

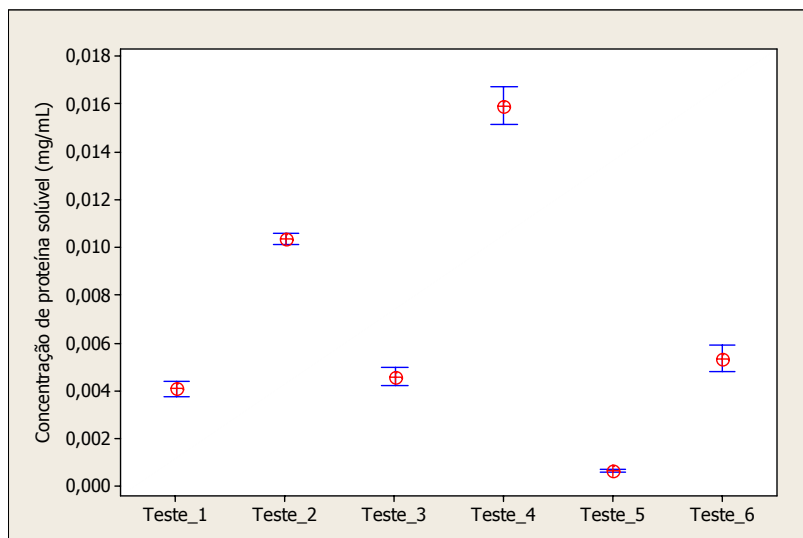


Figura 46: Concentração de proteína solúvel dos banhos dos testes de purga

Como já era de se esperar, estes valores foram os menores encontrados em comparação com os 24 testes realizados. Além de exibir uma nítida influência da variável tempo, o tipo de enzima também influenciou a remoção de proteínas. O teste 4 (3 horas, enzima B3) apresentou a maior concentração de proteínas, já o teste 5 apresentou a menor. Se for levado em consideração que, nas indústrias, a duração do teste de purga é de aproximadamente 30 minutos, conclui-se que os testes 1 e 3 apresentam o melhor desempenho.

A enzima C3 (tripsina microbiana) utilizada nos testes 5 e 6 é menos concentrada ou tem menor atividade, em comparação às enzimas A1 (tripsina pancreática) e B3, pois os resultados obtidos foram bem inferiores, para os dois tempos estudados.

Outra constatação obtida através da Figura 46 é com respeito à queda de velocidade de ação da enzima. Em 30 minutos, para os testes 1 e 4, a concentração de proteína liberada no banho era de aproximadamente 0,004 mg/ml, correspondendo a uma atividade enzimática de 0,008 mg/(ml*h). Após 3 horas de processo (testes 2 e 4) esta atividade diminuiu para 0,003 mg/(ml*h) no teste 2 e para 0,005 mg/(ml*h) no teste 4, indicando o avanço da reação enzimática (com conseqüente consumo de substrato).

De acordo com as análises de COT da Figura 47, as três enzimas utilizadas

apresentam atividades bastante próximas para o tempo de 30 minutos, porém, para os tempos de 3h, em ordem decrescente tem-se os resultados dos testes na ordem 4, 2 e 6, o que reproduz as constatações feitas pela análise de proteínas solúveis.

Apesar do comportamento similar, as diferenças entre os pontos foram menos acentuadas para COT. É provável que esta diferença possa ser explicada por alguma limitação no método de Lowry, pois este ensaio pode apresentar alguma restrição com relação ao tipo de proteína que pode ser detectado. Vale lembrar também que lipídeos são moléculas detectáveis pelo ensaio de COT e não detectáveis nos ensaios de proteína solúvel, o que pode levar a alguma interferência, também já constatada na comparação entre estas análises para os testes de remolho.

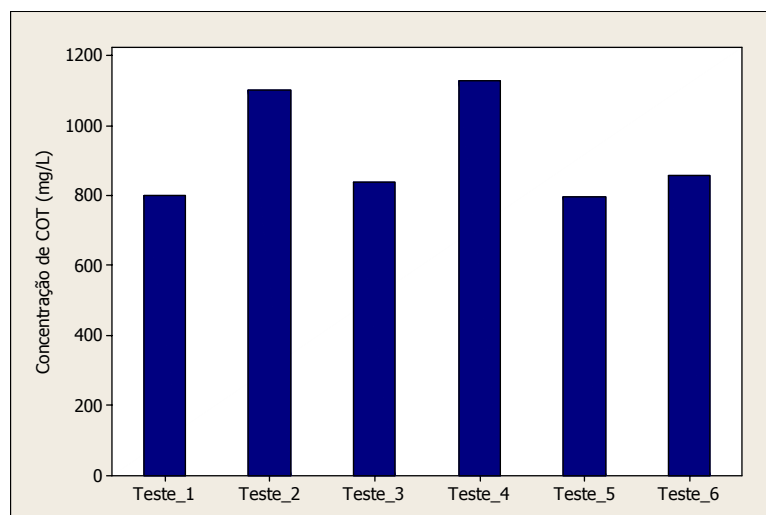


Figura 47: Análise teor de Carbono Orgânico Total para os banhos dos testes de purga

Silva e Pfeifer (2004) utilizaram formulações semelhantes com algumas das enzimas empregadas neste trabalho, concluindo que para os processos coenzimáticos, os valores de DBO, DQO e sulfetos foram menores que os processos químicos, o teor de substâncias extraíveis com diclorometano presente na pele também foi acentuadamente melhor, destacando ainda uma melhora nas propriedades físicas de resistência ao rasgo, tração e ensaios de alongação.

A Tabela 18 demonstra de forma resumida os resultados que foram

apresentados nos gráficos da Figura 47 e da Figura 46, juntamente com o desvio padrão para os ensaios de proteína solúvel.

Tabela 18: Resultados médios e desvio padrão dos ensaios realizados para os testes de purga

Análises realizadas			
Teste	COT	Proteína Solúvel	
	média (mg/l)	média (mg/ml)	DP
1	799,20	4,11E-03	1,29E-04
2	1100,00	1,04E-02	9,78E-05
3	838,30	4,60E-03	1,51E-04
4	1128,00	1,59E-02	3,15E-04
5	796,60	6,67E-04	3,23E-05
6	858,00	5,37E-03	2,22E-04

4.5. Caracterização Enzimática

Os testes de determinação da atividade enzimática (que é definida como a velocidade de conversão do substrato em produto) foram realizados apenas para algumas enzimas, isto porque a quantidade de substrato analítico era insuficiente para realização de um número maior de testes e o objetivo foi o de testar a aplicação destes métodos para aplicações posteriores pelo grupo de trabalho, no desenvolvimento de enzimas.

Os gráficos gerados a partir destes dados também utilizaram o *software* Minitab® 15, onde além dos valores médios, são plotados os intervalos de confiança de 95% para cada um dos pontos.

Para os ensaios de determinação da atividade enzimática sobre colágenos foram testadas as enzimas de purga C3, B3 e A1, aplicadas nas concentrações de 0,03, 0,06, 0,09 e 0,27%. O pH foi mantido fixo para todos os testes em 7,5 e a temperatura de 25°C. Estas enzimas tiveram suas atividades medidas em triplicata sobre o substrato FALGPA (N-(3-[2-Furyl]Acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala), conforme a metodologia apresentada no anexo.

Nestes testes de atividade de collagenases, uma unidade (padrão de medida utilizado em enzimologia) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1

μmol de FALGPA a 25 °C e pH 7,5. A Figura 48 apresenta os resultados obtidos para a enzima de purga A1, obtida a partir de extratos pancreáticos.

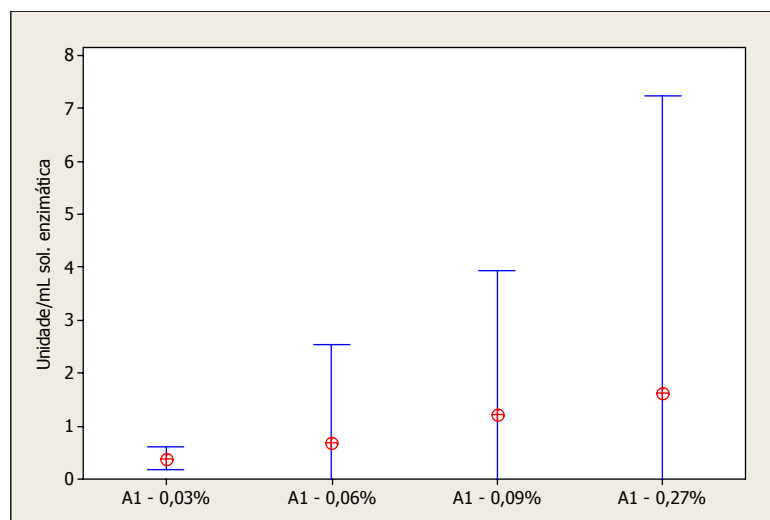


Figura 48: Caracterização de atividade de colagenases para a enzima A1 em diferentes concentrações

Observa-se uma baixa, porém crescente, variação do substrato com a concentração de enzimas, o que indica que esta enzima não tem elevada atividade sobre colágenos.

Já para os ensaios apresentados na Figura 49 (enzima C3), os resultados obtidos foram o dobro daqueles encontrados pela enzima A1. Também se verifica, para este caso, que a atividade enzimática (considerando-se apenas o valor médio e desconsiderando-se o intervalo de confiança) tem seu pico para a concentração de 0,09%. O elevado intervalo de confiança dos resultados apresentados se deve a dificuldade na execução da metodologia utilizada na análise.

A enzima B3 não apresentou atividade sobre os colágenos nos testes feitos. Na etapa de purga, a atividade da enzima frente a colágenos não é muito desejada, uma vez que podem ocorrer danos à estrutura, como a perda do contorno de grão, ou lisura da flor e também diminuição da resistência à tração. Por isto, usualmente, o tempo de exposição das peles à enzima gira em torno de 30 minutos. Logo, pode-se considerar que a enzima B3 apresentou o melhor resultado, uma vez que, atividades das enzimas frente a este substrato não foram detectadas pelo método.

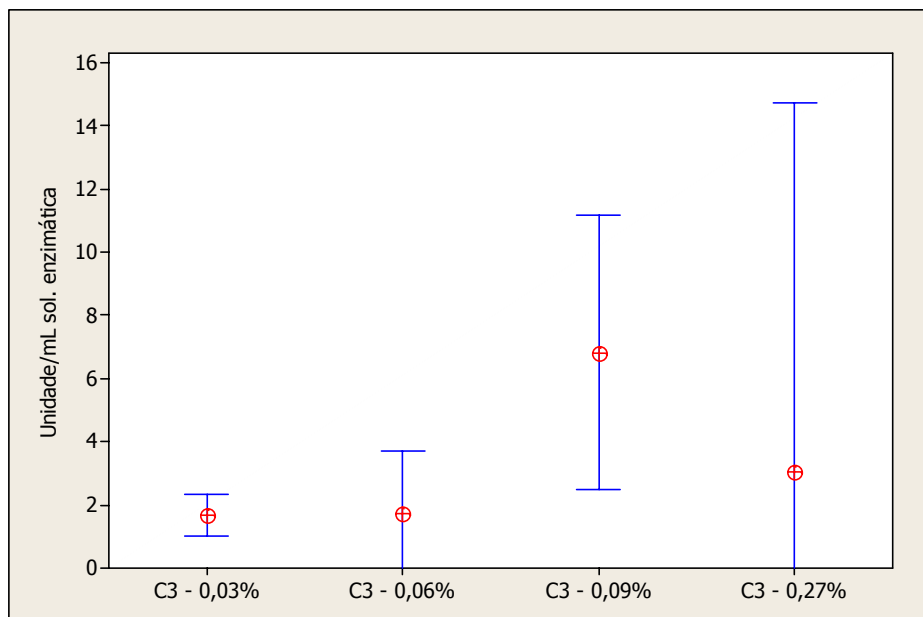


Figura 49: Caracterização enzimática de colagenases para as enzimas C3

Os ensaios de determinação da atividade de lipases foram realizados em triplicata e utilizou-se a metodologia empregada no trabalho de Volpato (2009). Foram testadas as mesmas enzimas anteriormente utilizadas (A1, B3 e C3), além de uma lipase (B1), nas mesmas concentrações anteriores (0,03, 0,06, 0,09 e 0,27%), temperatura ambiente e pH igual a 8,0.

A “unidade” (apresentada nos gráficos), neste caso, é a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 μmol de pNPP (substrato utilizado no testes) nas condições de pH utilizadas neste experimento.

Nestes ensaios, o intervalo de confiança obtido para os pontos experimentais foi bem menor, tornando estes resultados mais confiáveis.

A Figura 50 indica os resultados dos testes para a lipase B1.

Neste caso, bem como em todos os outros, observa-se que existe uma relação crescente, na faixa de concentração estudada, entre o percentual de enzima e a atividade enzimática.

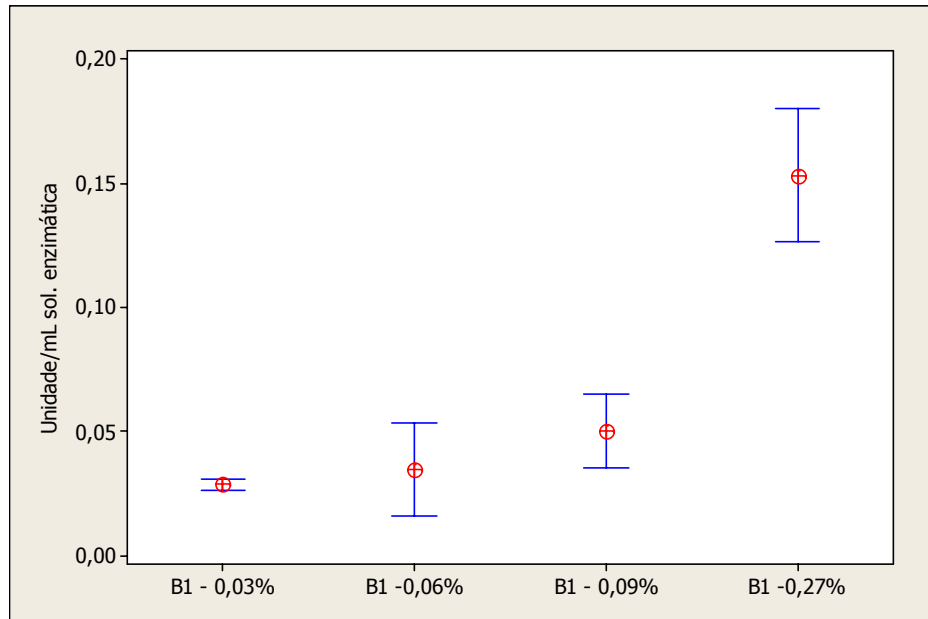


Figura 50: Caracterização enzimática de lipases para as enzimas B1

A Figura 51 apresenta os resultados encontrados para a enzima de purga B3. Para esta enzima a atividade enzimática é realmente baixa quando comparada aos resultados das outras enzimas testadas.

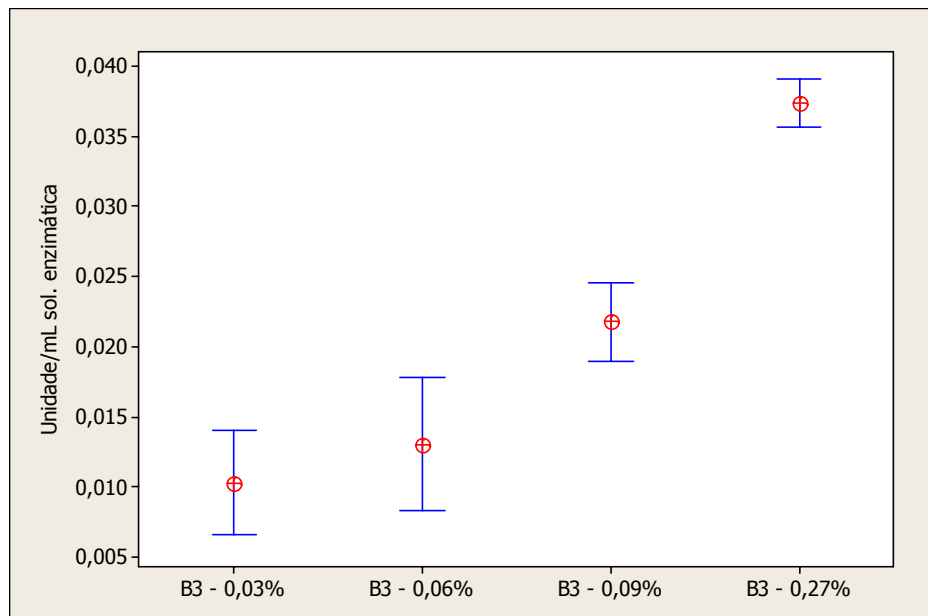


Figura 51: Caracterização enzimática de lipases para as enzimas B3

Os resultados da enzima de purga C3 (tripsina microbiana – denominação do fabricante), estão apresentados na Figura 52. Observa-se, neste caso, que a atividade frente a lipídeos é maior que aquela medida para a enzima B1 (classificada como lipase). Esta diferença pode ser explicada pelo processo de purificação da enzima, que, para isolar uma determinada enzima com ação específica, acaba excluindo outras de ação mais genérica que contribuem também na remoção de lipídeos. Como foi mencionado anteriormente, enzimas pancreáticas (tripsinas) possuem ação sobre diversos tipos de substratos. Já lipases são enzimas de atividade específica sobre lipídeos.

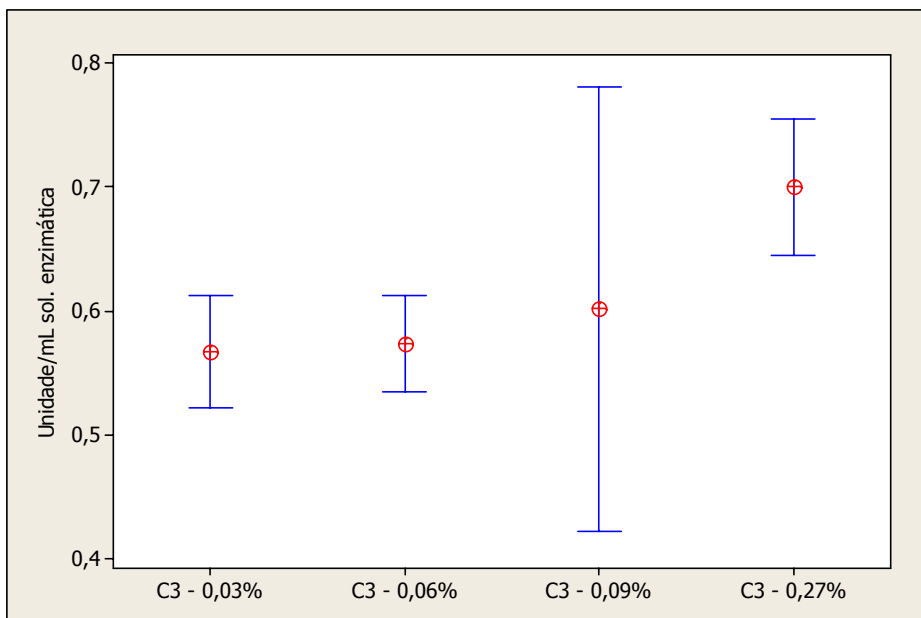


Figura 52: Caracterização enzimática de lipases para as enzimas C3

A última figura (Figura 53) demonstra os pontos experimentais obtidos pelas enzimas A1, tripsina obtida do pâncreas. Esta enzima, por ser menos purificada, apresenta atividade sobre diversos substratos e neste caso apresentou os melhores resultados de atividade sobre lipídeos em comparação com as demais enzimas.

Os testes de determinação da atividade enzimática auxiliam na compreensão dos resultados dos testes de purga, bem como na escolha do produto enzimático mais adequado para uma determinada função (remoção de proteínas não fibrilares,

ganho em área, remoção de gorduras, entre outros).

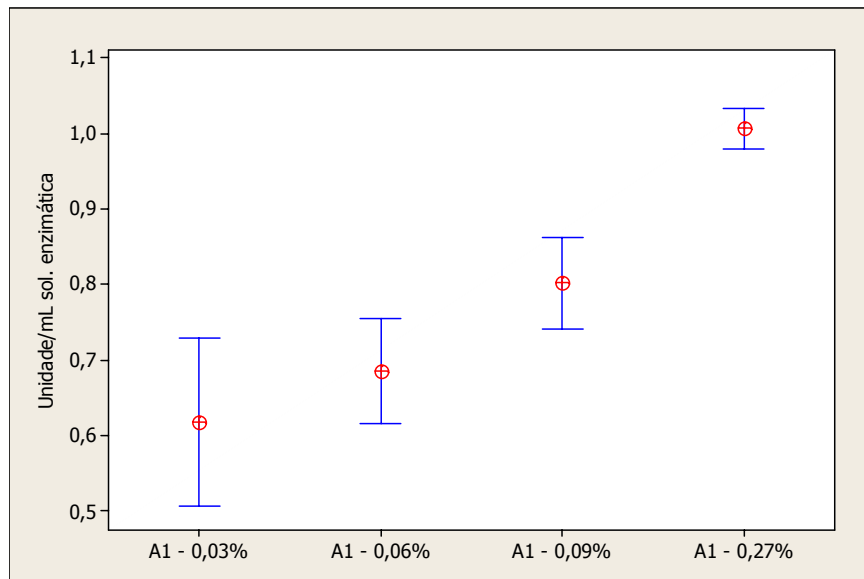


Figura 53: Caracterização enzimática de lipases para as enzimas A1

Cantera *et al.* (2004) em seu trabalho, fizeram uma caracterização completa de várias enzimas comerciais com relação a diversos substratos. Como conclusão, os autores colocaram em dúvida o comportamento dos preparados enzimáticos estudados e mencionaram a influência de diversos insumos que estão presentes nos processos e que podem atuar inibindo ou ativando a atividade da enzima.

Conclusões

Neste trabalho foi desenvolvido um estudo comparativo nas etapas de remolho, depilação, caleiro e purga, entre processos que se utilizam apenas de insumos químicos tradicionais na indústria do couro (chamados aqui de processos químicos) e processos que utilizam, além dos produtos químicos, enzimas para auxiliar o processamento (nomeados neste trabalho como processos coenzimáticos). Basicamente, o trabalho foi dividido em quatro partes. Os testes de remolho, testes de depilação e caleiro, testes de purga e, por fim, determinação da atividade enzimática de algumas enzimas testadas. Logo, será desta forma que as conclusões serão apresentadas.

A primeira dificuldade encontrada neste trabalho, apresentada inicialmente na seção 1.2 (página 5), foi ter que encontrar uma variável de resposta adequada, uma vez que as análises de matéria volátil, teor de substâncias extraíveis com diclorometano da pele e teor de sólidos dissolvidos voláteis dos banhos residuais apresentaram resultados com grande amplitude do intervalo de confiança. É claro que o problema nem sempre foi da metodologia, mas às vezes esteve relacionado à dificuldade intrínseca de diferenciação entre as tecnologias empregadas.

Com isso, a primeira conclusão apresentada diz respeito justamente aos ensaios utilizados na comparação entre processos químicos e coenzimáticos.

De acordo com as análises feitas, as diferenças entre os testes realizados são muito sensíveis em termos de resultados, ao contrário dos ensaios que apresentam

baixa sensibilidade, de modo que, a maior dificuldade encontrada neste trabalho foi encontrar variáveis robustas o suficiente, capazes de mensurar cada um dos processos estudados.

Analisando-se os testes feitos, percebe-se que para a maioria dos casos os testes de proteína solúvel e carbono orgânico total apresentaram o mesmo comportamento para um dado processo. As análises de proteína solúvel, além de serem fáceis de realizar, apresentaram um intervalo de confiança bastante estreito. Já as análises de COT requerem apenas uma estimativa média do teor de matéria orgânica encontrado na amostra para adequar o método da curva de calibração utilizada pelo equipamento.

É claro que os ensaios de proteína solúvel não avaliam o teor de proteínas em suspensão nos banhos, muito menos o teor de lipídeos, sendo estes, mensurados apenas pelo COT, no entanto, mostraram-se adequados para avaliar a liberação de proteoglicanos no banho.

Na etapa de remolho, observou-se que o tipo de enzima e o tempo de processamento apresentaram influência nos resultados dos testes. Nesta etapa, o teste 9 (enzima C1, 4 h) destacou-se em comparação aos demais, uma vez que as concentrações de matéria orgânica presente no banho foram no mínimo 60% maiores quando comparados aos testes químicos (teste 1 a 3). A variável concentração de enzima demonstrou que a dosagem utilizada pelo teste 9 foi bem estipulada, não sendo necessário adicionar maiores quantidades de enzimas.

No remolho, observou-se também que para as condições experimentais apresentadas, as enzimas B1 e B2 apresentaram desempenho comparável ou até mesmo inferior aos testes químicos, concluindo-se que além de um efeito de interação e competição pelo substrato, que acontece ao serem utilizadas juntas estas enzimas, a concentração utilizada (indicada pelo fabricante) é insuficiente para provocar melhorias significativas na etapa de remolho.

Partindo-se para as análises dos testes de depilação e caleiro, conclui-se que, embora os resultados para o teste 6 (enzimas B1 e B2, com concentração dobrada) apresentassem o maior valor, não se pode afirmar que existem diferenças significativas entre os testes coenzimáticos, devido ao intervalo de confiança dos

resultados das análises de proteínas solúvel. No entanto, é possível identificar diferenças nítidas entre os processos químicos e coenzimáticos, ao comparar os resultados das análises de MEV, COT e valores médios de proteína solúvel.

De um modo geral, os testes coenzimáticos demonstraram maior capacidade de remoção de matéria orgânica que os testes químicos, em todas as etapas estudadas. Destacam-se a enzima C1 no remolho, B1 e B2 na depilação e caleiro e a enzima B3 na purga.

Os resultados dos ensaios da determinação da atividade enzimática de collagenases indicam que as enzimas testadas (A1, C3 e B3) possuem baixa atividade com relação a este substrato, destacando-se a enzima B3 que não teve sua atividade detectada pelo método, o que está adequado à aplicação destas que não possuem o objetivo de hidrolisar o colagênio.

A Enzima A1 (enzima de purga proveniente do pâncreas bovino), apresentou os melhores resultados nos testes de determinação de atividade lipolítica, sendo esta enzima superior a enzimas classificadas como lípases.

A determinação da caracterização enzimática, que neste trabalho foi apenas especulativa, continua sendo desenvolvida pelo grupo de pesquisa do LACOURO, cujo objetivo maior é o isolamento de microorganismos e produção de enzimas para aplicação em processos da indústria coureira.

5.1. Análise do Setor

Por fim, fazendo-se um balanço do tema no setor coureiro, pode-se afirmar que o potencial da utilização de enzimas pela indústria não se encontra totalmente desenvolvido para os produtos oferecidos à indústria brasileira de couros, haja visto que, para etapas como a depilação e caleiro, onde os benefícios ambientais são imensos, o percentual de aplicação de enzimas não está bem otimizado, bem como faltam estudos sobre especificidade de enzimas.

A tendência para o setor nos próximos anos é a maior disseminação do uso de enzimas em etapas como remolho e, principalmente, depilação e caleiro. Com isto, espera-se, por parte das indústrias de bioprodutos, um salto no desenvolvimento, qualidade e confiabilidade destes produtos enzimáticos

comerciais.

5.2. Sugestões Para Trabalhos Futuros

Para dar continuidade a esta linha de pesquisa, sugere-se como trabalhos futuros a comparação de processos químicos e coenzimáticos nas etapas posteriores do processo, que são o pré-curtimento, curtimento, recurtimento e acabamento molhado.

Outro tema interessante seria a determinação dos percentuais ótimos de aplicação de enzimas nas diversas etapas de processamento (tanto na ribeira, quanto no curtimento e acabamento), levando-se em conta as atividades enzimáticas.

A caracterização destas enzimas comerciais é um tema que teve início neste trabalho, e, atualmente, segue como um dos objetivos do grupo de pesquisadores do LACOURO, estando inserido em um projeto maior, que visa à produção de enzimas com maior atividade e especificidade para diversas etapas do processamento de couros.

Referências Bibliográficas

ABNT. **Determinação do teor de cloretos em banhos.** NBR 13337: 2 p. 1995.

ABNT. **Teor de substâncias extraíveis com diclorometano.** NBR 11030: 3 p. 1997.

ABNT. **Determinação do teor de sólidos totais, fixos e voláteis em banhos de curtimento.** NBR 14550: 3 p. 2000.

ABNT. **Peles e Couros - Determinação do teor de matéria volátil.** NBR 11029: 3 p. 2001.

AHMED, M. M. e G. A. GASMELSEED. **Application of an enzymatic bate from local materials.** Journal of the Society of Leather Technologies and Chemists, v.87, n.4, p.135-137. 2003.

ALBERT, B., D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS e J. WATSON, D. **Molecular Biology of the cell.** NY: Garland. 1983

ALEXANDER, K. T. W. **Enzymes in the tannery - catalysts for progress?** Journal of the American Leather Chemists Association, v.83, n.9, p.287-316. 1988.

AMARAL, L., A., C. LUTCKMEIER, V., M. GUTTERRES e N. MARCÍLIO, R. **Descromagem de Resíduos de Couro Wet Blue Através de hidrólise enzimática.** XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Recife: 8 p. 2008.

ANANDAN, D., W. N. MARMER e R. L. DUDLEY. **Enzymatic dehairing of cattlehide with an alkaline protease isolated from Aspergillus tamarrii.** Journal of the American Leather Chemists Association, v.103, n.10, p.338-344. 2008.

AQUIM, P., M. **Balanco de massa: uma ferramenta para otimizar os processos de ribeira e curtimento.** PPGEQ, UFRGS, Porto Alegre, 2004.

AQUIM, P., M., F. MANCOPEDES e M. GUTTERRES. **Emprego de enzimas como processo alternativo de ribeira na produção de couro.** XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Recife, PE: 8 p. 2008.

ARAVINDHAN, R., S. SARAVANABHAVAN, P. THANIKAIVELAN, J. R. RAO e B. U. NAIR. **A chemo-enzymatic pathway leads towards zero discharge tanning.** Journal of Cleaner Production, v.15, n.13-14, p.1217-1227. 2007.

ASTM. **Standard test method for nitrogen content (Kjeldahl) and hide substance content of leather.** D2868: 3 p. 2007.

ASTM. **Standard practice for sampling leather for physical and chemical tests.** D2813: 2 p. 2008.

BAILEY, A., J., N. LIGTH, D. e E. ATKINS, D., T. **Chemical crosslinking restrictions on model for the molecular organization of the collagen fiber.** Nature, v.288, p.3. 1980.

BAJZA, Z. **Thermal and enzymatic recovering of proteins from untanned leather waste.** Waste Management, v.21, n.1, p.79-84. 2001.

BAJZA, Z. e I. V. VRCEK. **Water quality analysis of mixtures obtained from tannery waste effluents.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v.50, n.1, p.15-18. 2001.

BHAVAN, S., J. R. RAO e B. U. NAIR. **A potential new commercial method for processing leather to reduce environmental impact.** Environmental Science and Pollution Research, v.15, n.4, p.293-295. 2008.

BIENKIEWICZ, K., J. **Water: a system?** Journal of the Society of Leather Technologies and Chemists, v.85, p.21. 1990.

CANTERA, C., J. MARTEGANI, G. ESTERELLES e J. VERGARA. **Collagen hydrolysate: 'Soluble skin' applied in post-tanning processes - Part 2. Interaction with acrylic retanning agents.** Journal of the Society of Leather Technologies and Chemists, v.86, n.5, p.195-202. 2002.

CANTERA, C. S., M. L. GARRO, L. GOYA, C. BARBEITO e B. GALARZA. **Hair saving unhairing process: Part 6 stratum corneum as a diffusion barrier: Chemical-mechanical injury of epidermis.** Journal of the Society of Leather Technologies and Chemists, v.88, n.3, p.121-131. 2004.

CHOUDHARY, R. B., A. K. JANA e M. K. JHA. **Enzyme technology applications in leather processing.** Indian Journal of Chemical Technology, v.11, n.5, p.659-671. 2004.

CRISPIM, A. e M. MOTA. **Leather shavings treatment - An enzymatic approach.** Journal of the Society of Leather Technologies and Chemists, v.87, n.5, p.203-207. 2003.

DAYANANDAN, A., J. KANAGARAJ, L. SOUNDERRAJ, R. GOVINDARAJU e G. S. RAJKUMAR. **Application of an alkaline protease in leather processing: an ecofriendly approach.** Journal of Cleaner Production, v.11, n.5, p.533-536. 2003.

DEBELLE, L. e A. J. P. ALIX. **The structures of elastins and their function.** Biochimie, v.81, n.10, p.981-994. 1999.

DEBELLE, L. e A. M. TAMBURRO. **Elastin: molecular description and function.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v.31, n.2, p.261-272. 1999.

DETTMER, A. **Recuperação do cromo das cinzas do tratamento térmico de resíduos para a indústria calçadista visando o curtimento de peles.** (Dissertação). PPGEQ, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008. 96 p.

DETTMER, A., M. A. Z. AYUB e M. GUTTERRES. **Caracterização de enzimas comerciais aplicadas na produção de couros.** XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Foz do Iguaçu, PR: 7 p. 2010.

DING, H. **The relationship between the morphological change of the elastic fibres of goatskin and the effects of bating under different conditions.** Journal of the Society of Leather Technologies and Chemists, v.88, p.5. 2003.

DING, H. e C. LIANG. **The action of pancreatin on collagen fibres and interfibrillary substances during bating.** Journal of the Society of Leather Technologies and Chemists, v.90, p.7. 2005.

FAO. **World statistical compendium for raw hides and skins, leather and leather footwear 1988–2007.** Rome (Italy): Food and Agriculture Organization of the United Nations: 260 p. 2008.

FEAIRHELLER, S. H. **NEXT MAJOR CHANGE IN LEATHER MANUFACTURING TECHNOLOGY - WHAT IS IT LIKELY TO BE AND HOW CLOSE ARE WE TO IT?** Journal of the American Leather Chemists Association, v.80, n.12, p.312-323. 1985.

FRAZZETTO, G. **White Biotechnology.** European Molecular Biology Organization. 4: 3 p. 2003.

GANESH KUMAR, A., S. SWARNALATHA, B. SAIRAM e G. SEKARAN. **Production of alkaline protease by Pseudomonas aeruginosa using proteinaceous solid waste generated from leather manufacturing industries.** Bioresource Technology, v.99, n.6, p.1939-1944. 2008.

GILBERT, S. **Collagen types.** 2009 1998.

GUPTA, P. K. **Achieving Production Effectiveness and Increasing Business Competitiveness Through Cleaner Production 2000.**

GUPTA, R. e P. RAMNANI. **Microbial keratinases and their prospective applications: An overview.** Applied Microbiology and Biotechnology, v.70, n.1, p.21-33. 2006.

GUTTERRES, M. **Estrutura de colagênio da pele.** revista do Couro, n.170, 2004, p.5. 2004.

GUTTERRES, M. **Tendencias Emergentes en la Industria del Cuero.** Seminario Iberoamericano de Tecnología de Materiales. Havana. 1: 1-10 p. 2005.

GUTTERRES, M. **Apostilas de Tecnologia do Couro.** Porto Alegre: UFRGS -

Departamento de engenharia química 2010.

GUTTERRES, M., A. DETTMER, F. R. SOUZA, L. A. AMARAL e M. F. SOUSA. **Applications of Biotechnology in Leather**. China Leather, v.38, n.23, p.12-16. 2009.

HAMMES, A. S. **Estudo sobre a ação enzimática na produção do couro - etapa de remolho**. (Trabalho de Conclusão de Curso). DEQUI, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009. 48 p.

HEIDEMANN, E. In: (Ed.). fundamentals of leather manufacture. Darmstadt: Eduard Roether KG, 1993a. Practical and theoretical aspects of tanning, p.269-294

HEIDEMANN, E. In: E. R. Kg (Ed.). Fundamentals of leather manufacture. Darmstadt: Eduard Roether KG, 1993b. Preservation and beamhouse work, p.165-218

HEIDEMANN, E. In: (Ed.). Fundamentals of leather manufacture. Darmstadt: Eduard Roether KG, 1993c. Skins and hides in the leather industry, structure and composition, p.26-74

HERRMANN, L. **Enzimas no processo de industrialização do couro**. Revista do Couro, n.186, p.3. 2006.

HUBER, P. C., W. P. ALMEIDA e A. DE FÃ;TIMA. **Glutathione and related enzymes: Biological roles and importance in pathological processes**. Química Nova, v.31, n.5, p.1170-1179. 2008.

JIAN, S., T. WENYI e C. WUYONG. **Ultrasound-accelerated enzymatic hydrolysis of solid leather waste**. Journal of Cleaner Production, v.16, n.5, p.591-597. 2008.

KANAGARAJ, J., N. K. CHANDRA BABU e A. B. MANDAL. **Recovery and reuse of chromium from chrome tanning waste water aiming towards zero discharge of pollution**. Journal of Cleaner Production, v.16, n.16, p.1807-1813. 2008.

KANTH, S. V., R. VENBA, B. MADHAN, N. K. CHANDRABABU e S. SADULLA. **Cleaner tanning practices for tannery pollution abatement: Role of enzymes in eco-friendly vegetable tanning**. Journal of Cleaner Production, v.17, n.5, p.507-515. 2009.

KOLOMAZNIK, K., M. ADAMEK, I. ANDEL e M. UHLIROVA. **Leather waste-- Potential threat to human health, and a new technology of its treatment**. Journal of Hazardous Materials, v.160, n.2-3, p.514-520. 2008.

KUPEC, J., M. DVORÃ;CKOVÃ;S, S. RUDLOVÃ;J, J. RUZICKA e K. KOLOMAZNÃ;K. **Deproteination of chrome waste by washing and enzymatic hydrolysis**. Journal of the American Leather Chemists Association, v.97, n.9, p.349-354. 2002.

LEHNINGER, A., L. **Componentes moleculares das células**. SP: Edgard Blücher, v.1. 1976 (Bioquímica).

LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR e R. J. RANDALL. **Protein**

measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem, v.193, p.10. 1951.

MACEDO, A. J., W. O. BEYS DA SILVA, R. GAVA, D. DRIEMEIER, J. A. PÃAGAS HENRIQUES e C. TERMIGNONI. **Novel keratinase from Bacillus subtilis S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities.** Applied and Environmental Microbiology, v.71, n.1, p.594-596. 2005.

MADHUMATHI, M., S. CHEERLA, S. SARAVANABHAVAN, P. THANIKAIVELAN, J. R. RAO, N. K. C. BABU e B. U. NAIR. **Factors influencing activity of enzymes and their kinetics: Bioprocessing of skin.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v.136, n.3, p.265-278. 2007.

MAGIN, T. M., P. VIJAYARAJ e R. E. LEUBE. **Structural and regulatory functions of keratins.** Experimental Cell Research, v.313, n.10, p.2021-2032. 2007.

MARMER, W. N. e R. L. DUDLEY. **The oxidative degradation of keratin (wool and bovine hair).** Journal of the American Leather Chemists Association, v.101, n.11, p.408-415. 2006.

MARSAL, A., J. COT, E. G. BOZA, P. J. CELMA e A. M. MANICH. **Oxidizing unhairing process with hair recovery. Part I. Experiments on the prior hair immunization.** Journal of the Society of Leather Technologies and Chemists, v.83, n.6, p.310-315. 1999.

MARSHALL, R. C., D. F. G. ORWIN e J. M. GILLESPIE. **Structure and biochemistry of mammalian hard keratin.** Electron Microscopy Reviews, v.4, n.1, p.47-83. 1991.

MONTAGNA, W. **The structure and function of the skin.** New York: Academic. 2ª ed. 1962. 454 p.

MUKHTAR, H. e I. U. HAQ. **Production of alkaline protease by Bacillus subtilis and its application as a depilating agent in leather processing.** Pakistan Journal of Botany, v.40, n.4 SPEC. ISS., p.1673-1679. 2008.

PACHECO, J. W. F. **Curtumes.** Série P + L. CETESB: 77 p. 2005.

PARVINZADEH, M. **Effect of proteolytic enzyme on dyeing of wool with madder.** Enzyme and Microbial Technology, v.40, p.4. 2007.

PASSOS, J., B. **Reuso de água: uma proposta de redução do consumo de água em curtumes.** (Dissertação). PPGEQ, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007. 99 p.

PAULING, L. e R. COREY, B. **The structure of fibrous proteins of the collagen-gelatin group.** Proc natl acad sci, v.37(5), p.10. 1951.

PEREIRA, S., V. **Obtenção de cromato de sódio a partir das cinzas de incineração de resíduos do setor calçadista visando a produção de sulfato básico de cromo.** (Dissertação). PPGEQ, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006. 122 p.

QIO, Z., C. WUYONG e H. PETR. **Effects of Surfactants on Enzyme and Skin in Bating Process**. XXX Congresso IULTCS. Pequim 2009.

RAJAMANI, S., K. STREIT, F. e P. CASEY. **Environmental update on world leather sector from International Union of Environmental Commission of IULTCS**. XVIII Congresso Iationo-americano dos químicos e técnicos da indústria do couro. Rio de Janeiro 2008.

RAJPUT, A. S. D. **Enzymes and biotechnology for cleaner leather processing**. Current Science, v.96, n.11, p.1439-1440. 2009.

RAMACHANDRAN, G. N. e G. KARTHA. **Structure of Collagen**. Nature, v.174, n.4423, p.269-270. 1954.

RAMIREZ e E. AL. **Proceso de Ribeira: Revisión a los procesos químicos**. XXVII Congresso IULTCS. Cancún 2003.

RAO, J. R. e E. AL. **Recouping the wastewater: a way forward for cleaner leather processing**. Journal of Cleaner Production, n.11, p.9. 2003.

REICH, G. In: (Ed.). From collagen to leather - the theoretical background. Ludwingshafen, 2007a. Physical and chemical processes on collagen and its transformation into the leather matrix, p.31-92

REICH, G. In: (Ed.). From collagen to leather - the theoretical background. Ludwingshafen, 2007b. The theory of tanning - past, present, future, p.93-129

REICH, G. In: (Ed.). From collagen to leather - the theoretical background. Ludwingshafen, 2007c. What is leather? the structure and reactivity of collagen, p.1-30

RIEGEL, R. E. **Bioquímica**. São Leopoldo: Editora Unisinos. 1996. 402 p.

RIFFEL, A., S. ORTOLAN e A. BRANDELLI. **De-hairing activity of extracellular proteases produced by keratinolytic bacteria**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v.78, n.8, p.855-859. 2003.

ROBERT, L. **Elastin, past, present and future**. Pathologie Biologie, v.50, n.8, p.503-511. 2002.

RUI, W., M. CHEN, H. CHEN e L. ZHIQIANG. **Enzyme unhairing - An eco-friendly biotechnological process**. Journal of the Society of Leather Technologies and Chemists, v.93, n.2, p.51-55. 2009.

SANTOS, A. **Guia Brasileiro do Couro**. ABQTIC. 2008.

SARAVANABHAVAN, S., R. ARAVINDHAN, P. THANIKAIVELAN, B. CHANDRASEKARAN, J. R. RAO e B. U. NAIR. **An integrated eco-friendly tanning method for the manufacture of upper leathers from goatskins**. Journal of the Society of Leather Technologies and Chemists, v.87, n.4, p.149-158. 2003.

SARAVANABHAVAN, S., P. THANIKAIVELAN, J. R. RAO e B. U. NAIR. **Silicate**

Enhanced Enzymatic Dehairing: A New Lime-Sulfide-Free Process for Cowhides. *Environmental Science & Technology*, v.39, n.10, p.3776-3783. 2005.

SARAVANABHAVAN, S., P. THANIKAIVELAN, J. R. RAO, B. U. NAIR e T. RAMASAMI. **Sodium Metasilicate Based Fiber Opening for Greener Leather Processing.** *Environmental Science & Technology*, v.42, n.5, p.1731-1739. 2008.

SIERPINSKI-HILL, P., H. BRANTLEY e M. VAN DYKE. **Some properties of keratin biomaterials: Kerateines.** *Biomaterials*, v.In Press, Corrected Proof.

SILVA, C. A. J. e R. PFEIFER. **Enzimas en la industria del cuero: revisión de conceptos, tipos de aplicación y resultados prácticos.** *Tecnología del Cuero*, v.51, n.11, p.12. 2004.

SILVA, I., V. **Utilização de hidrolizado proteico de couro como produto recorrente.** (Dissertação). PPGEQ, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008. 151 p.

SILVEIRA, M., W. **Horizontes para o couro.** *Jornal Exclusivo*. Novo Hamburgo 2009.

SIVASUBRAMANIAN, S., B. M. MANOHAR e R. PUVANAKRISHNAN. **Mechanism of enzymatic dehairing of skins using a bacterial alkaline protease.** *Chemosphere*, v.70, n.6, p.1025-1034. 2008.

SIVASUBRAMANIAN, S., B. MURALI MANOHAR, A. RAJARAM e R. PUVANAKRISHNAN. **Ecofriendly lime and sulfide free enzymatic dehairing of skins and hides using a bacterial alkaline protease.** *Chemosphere*, v.70, n.6, p.1015-1024. 2008.

SMITH, J., W. **Molecular pattern in native collagen.** *Nature*, v.219, p.2. 1968.

TAYLOR, M. M., D. G. BAILEY e S. H. FEAIRHELLER. **Review of the Uses of Enzymes in the Tannery.** *Journal of the American Leather Chemists Association*, v.82, n.6, p.153-165. 1987.

THANIKAIVELAN, P., J. R. RAO, B. U. NAIR e T. RAMASAMI. **Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing.** *Trends in Biotechnology*, v.22, n.4, p.181-188. 2004.

THANIKAIVELAN, P., J. R. RAO, B. U. NAIR e T. RAMASAMI. **Recent trends in leather making: Processes, problems, and pathways.** *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v.35, n.1, p.37-79. 2005.

VALEIKA, V., K. BELESKA, V. VALEIKIENE e V. KOLODZEISKIS. **An approach to cleaner production: from hair burning to hair saving using a lime-free unhairing system.** *Journal of Cleaner Production*, v.17, n.2, p.214-221. 2009.

VOET, D., J. VOET, G. e C. PRATT, W. In: (Ed.). *Fundamentals of biochemistry*. NY: John Wiley & Sons, Inc., 1999a. Amino Acids, p.77-92

VOET, D., J. VOET, G. e C. PRATT, W. In: (Ed.). *Fundamentals of Biochemistry*. NY:

John Wiley & Sons, Inc., 1999b. Carbohydrates, p.195-218

VOET, D., J. VOET, G. e C. PRATT, W. In: (Ed.). Fundamentals of biochemistry. NY: John Wiley & Sons, Inc., 1999c. Enzymatic Catalysis, p.281-321

VOET, D., J. VOET, G. e C. PRATT, W. In: (Ed.). Fundamentals of biochemistry. NY: John Wiley & Sons, Inc., 1999d. Enzyme kinetics, inhibition, and regulation, p.322-350

VOET, D., J. VOET, G. e C. PRATT, W. In: (Ed.). Fundamentals of biochemistry. NY: John Wiley & Sons, Inc., 1999e. Lipids, p.219-238

VOET, D., J. VOET, G. e C. PRATT, W. In: (Ed.). Fundamentals of biochemistry. NY: John Wiley & Sons, Inc., 1999f. Proteins: Three-dimensional Structure, p.124-160

VOLPATO, G. **Produção, purificação e imobilização de lipases de *staphylococcus warnieri* EX17 produzidas em glicerol.** (Tese). DEQUI, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. 158 p.

WINKLER, U. K. e M. STUCKMANN. **Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*.** J. Bacteril., v.138, p.8. 1979.

YILMAZ, O., I. CEM KANTARLI, M. YUKSEL, M. SAGLAM e J. YANIK. **Conversion of leather wastes to useful products.** Resources, Conservation and Recycling, v.49, n.4, p.436-448. 2007.

YUAN, J., X. FAN, Q. WANG, P. WANG e L. CUI. **Modification of wool fiber with protease - 1. Effect of ionic liquid pretreatment.** Journal of Biotechnology, v.6, p.3. 2008.

Anexos

Metodologias Usadas nas Análises dos Testes:

Determinação de Cloretos em Banhos

Percentual de Matéria Volátil

Análise de Nitrogênio e Substância Dérmica em Couro

Determinação do Teor de Substâncias Extraíveis com Diclorometano e Hexano

Determinação do Teor de Sólidos Totais, Fixos e Voláteis em Banhos

Determinação de Proteína Solúvel

Determinação da atividade lipolítica

Determinação de atividade colagênica

Determinação de Cloretos em Banhos - NBR 13337/1995

1. Objetivo:

Determinação da concentração de Cloreto de sódio em banhos residuais de pré-remolho, remolho, água de lavagem e caleiro.

2. Materiais e métodos:

2.1. Reagentes:

solução de Cromato de potássio 6%;

solução padrão de Nitrato de prata 0,1 N;

água destilada;

2.2. Procedimento:

pipetar 2 ml da amostra para um Erlenmeyer;

adicionar 20 ml de água destilada;

adicionar 2 ml de Cromato de potássio 6%;

titular com a solução de Nitrato de prata até a obtenção da coloração vermelho-tijolo;

3. Cálculos:

A concentração de Cloreto de sódio em g/l é calculada a partir da seguinte equação:

$$\text{NaCl} = V_1 \times f_c \times 2,925$$

onde:

NaCl = concentração de Cloreto de sódio, g/l;

V_1 = volume de Nitrato de prata gasto na titulação, em ml;

f_c = fator de correção do Nitrato de prata;

Percentual de Matéria Volátil, NBR-8290/1983

1. Objetivo:

Determinar o percentual de substâncias voláteis, massa perdida pela pele ou couro quando seco à temperatura de $102\pm 2^\circ\text{C}$ até que se atinja massa constante.

2. Material e métodos:

2.1. Procedimento:

Cortar aproximadamente 10g da amostra em pedaços pequenos com medidas não superiores a 5x5 mm;

Secar os pesa-filtros por no mínimo 5h antes de proceder a análise;

Pesar aproximadamente 3g da amostra com precisão de 0,0001g em um pesa-filtro previamente tarado;

Levar à estufa a ($102\pm 2^\circ\text{C}$) até massa constante, aproximadamente 12h;

Resfriar em dessecados por no mínimo 30 minutos;

Pesar novamente o frasco;

2.2. Observações:

Realizar o ensaio em triplicata;

3. Cálculos:

O teor de matéria volátil é dado pela seguinte equação:

$$\text{MV} = (M2-M3 / M2-M1)*100$$

onde:

MV = teor de matéria volátil;

M1 = massa do pesa-filtro vazio, em gramas;

M2 = massa do pesa-filtro com amostra, antes do ensaio, em gramas;

M3 = massa do pesa-filtro com amostra, após secagem, em gramas;

Determinação do Teor de Substâncias Extraíveis com Diclorometano e Hexano, NBR – 11030/1997

1. Objetivo:

Este método visa a determinação da fração total de substâncias, gorduras, solúveis nos solventes Diclorometano e Hexano em todos os tipos de peles e couros. As substâncias em questão são, portanto, compostos apolares e/ou pouco polares, provenientes de operações de engraxe, no caso de couros e gorduras naturais produzidas durante a vida do animal.

2. Materiais e Métodos:

2.1. Aparelhagem/ vidraria

extrator do tipo Soxhlet;

balança analítica;

estufa;

dessecador;

2.2. Reagentes:

Diclorometano P.A.;

Hexano P.A.;

2.3. Procedimento:

secar os frascos do determinador de gorduras por no mínimo 5h em estufa a $102\pm 2^{\circ}$ Ce pesá-los em balança analítica;

pesar, por diferença, aproximadamente 5g de amostra para o interior da cápsula do aparelho, em balança analítica, utilizando luvas ou pinça a fim de não haver contaminação por gorduras presente nas mãos;

acoplar as cápsulas ao extrator;

adicionar 100 ml do solvente a ser utilizado em cada frasco coletor;

ligar o aparelho à temperatura de 130° C e o arrefecimento, através da abertura da torneira de água;

proceder a extração por 4h, 1 h com o cartucho imerso no solvente e 3h com o solvente gotejando;

passado o período inicial, fechar o compartimento superior a fim de proceder a recuperação do solvente;

após aproximadamente 1h, o solvente, devidamente recuperado deverá estar totalmente contido no compartimento superior, permitindo a retirada dos frascos coletores, quando usado hexano demora mais tempo;

desligar o aparelho e a água de arrefecimento;

erguer os conjuntos de extração a fim de que esfriem por um período de 5 minutos;

remover os frascos dos conjuntos e coloca-los na estufa a fim de evaporar o solvente residual, cuidado, muito solvente na estufa pode causar explosões.

recolher o solvente recuperado para o interior de um frasco devidamente identificado;

ao término do tempo de secagem, pesar os frascos, não deve exceder 1 hora;

3. Cálculos:

O teor de substâncias extraíveis, em percentual, é calculado a partir da seguinte expressão:

$$\% \text{ gorduras} = (P2 - P1) / (m * (1 - MV))$$

onde:

% gorduras = teor de substâncias extraíveis em %;

P1 = peso inicial do frasco coletor;

P2 = peso do frasco coletor após a extração, contendo o material extraído;

m = massa inicial de amostra adicionada à cápsula do extrator;

MV = teor de matéria volátil, previamente analisado;

Análise de Nitrogênio e Substância Dérmica em Couro – ASTM D2868/2007

Visão geral do Método

A amostra é aquecida na presença de H₂SO₄ concentrado, K₂SO₄, e CuSO₄, e é digerida até a solução ficar incolor ou amarelo pálido. Então a solução é resfriada. Em seguida a mesma é tratada/alcalinizada com solução de tiosulfato de sódio e hidróxido de sódio. O nitrogênio é então destilado em uma solução de ácido bórico e o total de nitrogênio é determinado por titulometria. A substância dérmica é calculada com base no valor de nitrogênio.

Materiais

Bloco digestor: um aparelho digestor para balões Kjeldahl com sucção para remoção de SO₃ e água.

Balões de Kjeldahl: um frasco especial adequado ao equipamento de digestão e destilação com em media 100 a 800 ml de capacidade.

Destilador de Nitrogênio: aparato equipado com caldeira para arraste de vapor e condensador para destilação da amônia no frasco de Kjeldahl conectado.

Reagentes

Solução indicadora de Ácido Bórico.

Solução indicadora mista.

Mistura catalítica.

Hidróxido de Sódio 40%.

Hidróxido de Sódio Padrão 0,1N.

Ácido Sulfúrico Padrão 0,3N.

Ácido Sulfúrico concentrado livre de nitrogênio.

Tiosulfato de sódio 80 g/l.

Padronização

Branco: Faça uma determinação em branco substituindo a amostra por 1g de sacarose e seguindo exatamente o procedimento para as amostras.

Pode ser usado um padrão de glicina para testar o método.

Procedimento

Amostragem e digestão: Adicione $5g \pm 0,1g$ de mistura catalítica ao frasco de Kjeldahl. Pese $0,75 \pm 0,1g$ de amostra com precisão de $0,0001g$, anote e transfira a mesma para o frasco de Kjeldahl. Manuseando com cuidado na capela adicione 13 ml de ácido sulfúrico concentrado, mexa suavemente o frasco e tampe o mesmo. Coloque o frasco no bloco digestor, ligue a água e o aquecimento no máximo. Proceda a digestão por no mínimo 3h. Confira se a solução ficou transparente, caso contrário continuar digerindo. Assim que digestão for concluída, desligar o digestor e deixar os frascos esfriarem.

Destilação: Adicione cerca de 15 ml de tiosulfato de sódio. Agite a solução até ficar marrom. Adicione uma alíquota volumétrica de 50 ml de solução indicadora de ácido bórico a um erlenmeyer de 300 ml, que será o frasco receptor do destilador, a ponta de saída do destilador deve ficar mergulhada na solução indicadora. Conecte o frasco de Kjeldahl ao destilador. Ligue a alimentação de água do destilador, adicione cerca de 50 ml de hidróxido de sódio 40%. Confira o nível de água da caldeira. Ligue o aquecimento da caldeira assim que todo o hidróxido de sódio tenha sido adicionado a amostra. Proceda a destilação até que tenha sido recolhido no mínimo 75 ml de destilado.

Titulação: Titule o destilado imediatamente com ácido sulfúrico padrão até o ponto final (ausência de coloração verde). No caso do branco a titulação ocorre com hidróxido de sódio padrão até o ponto final verde se a solução ficar violeta. Se o branco ficar verde também é titulado com ácido sulfúrico padrão.

Cálculos

Branco: O valor obtido para o branco, caso a titulação deste tenha sido feita com hidróxido de sódio, deve ser convertido para volume de ácido sulfúrico pela

seguinte fórmula:

$$B = (V_b \times N_b) / N_a$$

Onde:

B = Volume do branco, convertido para milímetros de ácido sulfúrico padrão.

V_b = Volume de hidróxido de sódio padrão requerido na titulação.

N_b = Normalidade da solução de hidróxido de sódio padrão.

N_a = Normalidade da solução de ácido sulfúrico padrão.

Nitrogênio na amostra: O valor de nitrogênio na amostra é calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Nitrogênio}(\%) = [(A \pm B) \times N \times 0,014] \times 100 / P$$

Onde:

A = Volume de ácido sulfúrico padrão requerido na titulação do destilado.

B = Volume de hidróxido de sódio padrão requerido na titulação do branco. Use sinal positivo caso o branco tenha sido titulado com hidróxido de sódio. Caso tenha sido titulado com ácido sulfúrico use sinal negativo.

N = Normalidade do ácido sulfúrico padrão.

P = Massa da amostra em gramas.

Nitrogênio base seca: O valor de nitrogênio na amostra é então convertido para base seca, utilizando o percentual de matéria volátil. Para este valor ser válido, a amostra utilizada para a análise de matéria volátil deve ser pesada no mesmo instante que a amostra utilizada para nitrogênio.

$$\% \text{ NTK, base seca} = C \times 100 / 100 - M$$

Onde:

%NTK = percentagem de nitrogênio total determinado por Kjeldahl.

C = percentual de nitrogênio da amostra em base úmida.

M = Percentual de matéria volátil da amostra.

Substância dérmica: O percentual de substância dérmica pode ser calculado ao multiplicar o valor encontrado para NTK pelo fator 5,62.

Preparação das soluções

Solução indicadora de Ácido Bórico: Dissolva 40g de ácido bórico (H_3BO_3) em água, adicione 20ml da solução indicadora mista e dilua a 1L.

Solução indicadora mista: Dissolva 0,060g de indicador vermelho de metila e 0,040 g de indicador azul de metileno em 100ml de álcool etílico 95%.

Mistura catalítica: 100g K_2SO_4 + 3g $CuSO_4$.

Hidróxido de Sódio 40%: Dissolva aproximadamente 400g de lentilhas de NaOH (98%) em água e dilua a 1L.

Hidróxido de Sódio Padrão 0,1N: Dissolva 10ml da solução concentrada de NaOH (40%) em 1L de água destilada. Determine a normalidade exata por volumetria de neutralização com o ácido sulfúrico padrão usando o indicador misto para o ponto final **Ácido Sulfúrico Padrão 0,3N:** Dissolva 9ml de H_2SO_4 concentrado em água e dilua a 1L. Determine a normalidade exata por titulação com um padrão primário assim como carbonato de sódio anidro ou tris(hidroximetil)aminometano.

Ácido Sulfúrico concentrado livre de nitrogênio.

Tiosulfato de sódio 80 g/l: Dissolva 80g de tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) em água e dilua a 1L.

Determinação do Teor de Sólidos Totais, Fixos e Voláteis em Banhos (adaptado a partir da norma NBR14550/2000)

Preparo da areia:

Utilizar areia previamente filtrada, colocar em um kitassato 4 dedos de areia mais 1 dedo de excesso de ácido nítrico. Levar para a chapa aquecedora, dentro da capela, até o início da ebulição do ácido, e então deixar ebulir por 2 horas.

Feito isso, entornar o conteúdo do kitassato em uma jarra de plástico, para então iniciar o processo de lavagem da areia.

A lavagem da areia é feita através da adição de água à jarra, agitando-se a areia para que possa ocorrer uma melhor lavagem de todo o conteúdo e o posterior descarte da água de lavagem. Quando o pH da mistura H₂O+areia estiver igual ao pH da água da torneira, é necessário que se faça mais 3 lavagens da areia utilizando água destilada.

Após a lavagem, a areia deve ser calcinada. Para isso, utilizamos cápsulas de porcelana. Com a areia ainda úmida, colocar uma quantidade compatível com o tamanho da cápsula e levar à mufla por 1 hora a 700°C. Finalizado esse processo, obtém-se a areia calcinada.

Tarar as cápsulas de porcelana

Leva-se à mufla à temperatura de 550°C – 600°C por 1 hora

ST (sólidos totais):

Com as cápsulas previamente taradas, adicionar cerca de 20g de areia calcinada à cada cápsula, levar a cápsula com areia a mufla a 105°C por 1 hora, tirar, esfriar em dessecador, pesar e anotar o resultado. Adicionar 25ml da amostra homogeneizada ao adicionar amostra líquida, utilizar uma peneira para “reter” partículas muito grandes que possam prejudicar a análise de sólidos do banho.

Levar a cápsula à estufa até se obter apenas sólidos na cápsula. Para

certificar-se de que não existe mais umidade na cápsula, recomendo deixar a amostra na estufa de um dia para o outro ou até peso constante. Assim, retira-se a amostra da estufa e deixe-a esfriar em dessecador. Quando a cápsula estiver à temperatura ambiente, que deve levar cerca de 40 minutos, pesar a amostra em balança analítica e anotar o resultado.

SDF (sólidos fixos):

Levar a cápsula utilizada na determinação de SDT para a mufla à temperatura de 550°C – 600°C por 2 horas. Cuidar ao abrir a mufla. A mufla deve ser aberta somente à temperaturas inferiores a 400°C, pois a temperaturas mais elevadas pode ocorrer danos na mesma se aberta abruptamente. Retirar a cápsula da mufla e esfriar em dessecador. Pesar a amostra e anotar o resultado.

SV (sólidos voláteis):

É obtido indiretamente através da diferença entre os dois resultados anteriores

Resultados e cálculos:

$$ST = \frac{(A - B) \times 1.000.000}{V}$$

V

onde:

SDT representa os sólidos dissolvidos totais, em miligramas por litro;

A é a massa da cápsula com o resíduo (após a estufa), em gramas;

B é a massa da cápsula com areia, em gramas;

V é o volume da amostra, em mililitros.

$$\text{SF} = \frac{(C - B) \times 1.000.000}{V}$$

V

onde:

SDF representa os sólidos dissolvidos fixos, em miligramas por litro;

C é a massa da cápsula com o resíduo (após a mufla), em gramas;

B é a massa da cápsula com areia, em gramas;

V é o volume da amostra, em mililitros.

$$\text{SV} = \text{ST} - \text{SF}$$

onde:

SV representa os sólidos voláteis, em miligramas por litro;

ST representa os sólidos totais, em miligramas por litro;

SF representa os sólidos fixos, em miligramas por litro.

Determinação de Proteína Solúvel - Método de Lowry

Fundamento Teórico

O método de Lowry *et al.* (1951) é um método colorimétrico para estimativa quantitativa de proteínas totais.

O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto com absorção máxima em 750nm.

O mecanismo de redução do reagente de Folin-Ciocalteu por proteínas ocorre diretamente através das cadeias laterais de alguns aminoácidos (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina), que contribuem com quatro elétrons, ou através da retirada de dois elétrons de cada unidade tetrapeptídica dos peptídeos e proteínas, que é facilitada pela formação do quelato entre o cobre (II) e peptídeos/proteínas.

Aplicações

A principal vantagem do método de Lowry é a sua alta sensibilidade e, por isto, tem sido utilizado para a determinação da concentração de proteínas totais em diversos meios, sendo eles: plasma sanguíneo, saliva humana, tecido animal, plantas, suco biliar, membranas, leite, derivados do leite e produtos alimentícios (Zaia *et al.*, 1998).

Segundo os mesmos autores, o método de Lowry é recomendado, pois no estudo comparativo de metodologias o mesmo mostrou-se sensível, com melhor exatidão, menor consumo de amostra e, dependendo do caso, menos suscetível a alguns tipos de interferentes.

Reagentes e soluções:

Reagente A: Dissolver 0,5g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 1,0g de citrato de sódio (citrato de Na_3) em 100ml de água destilada. Esta é uma solução estável e pode ser preparada com antecedência.

Reagente B: Dissolver 20,0g de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e 4,0g de hidróxido de sódio (NaOH) em 1,0L de água destilada. Solução não estável, deve ser preparada na hora da análise.

Reagente C: Misturar 1,0ml do reagente A e 50,0ml do reagente B.

Reagente D: Reagente Folin-Ciocalteus 2N e água destilada preparados na proporção 1:1. É uma solução estável.

Solução padrão de BSA (Bovine Serine Albumine) (0,5mg/ml).

Procedimentos:

Para determinar a concentração de proteínas da amostra, construir uma curva padrão de calibração com cinco concentrações diferentes de proteína, BSA – 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,4; 0,5 mg/ml.

Adicionar 2,5ml do reagente C a um tubo de ensaio contendo 500 μL de amostra diluída apropriadamente (contendo até 0,5mg/ml) de proteínas e misturar bem. A amostra deve ser diluída de forma que sua concentração fique dentro da amplitude da curva de calibração. Normalmente, diluições de 40 vezes são suficientes (50 μL de amostra + 1950 μL de água destilada);

Incubar a temperatura ambiente por 5-10 minutos;

Adicionar a seguir 250 μL do reagente D, misturar bem e incubar novamente por 30 minutos;

Ler a absorvância à 750nm.

A concentração das amostras é determinada pela interpolação dos valores de absorvância na curva padrão.

Obs.: A curva de calibração deve ser feita todas as vezes que a metodologia for utilizada, já que alguns reagentes não são estáveis e devem ser preparados no momento da análise.

Determinação da atividade lipolítica - Método de Winkler e Stuckmann 1979

Reagentes e soluções:

solução A: Dissolver 30 mg de pNPP em 10 ml de propanol-2 e misturar a uma solução B.

2. Solução B: Dissolver 400mg de triton 100-x e 100mg de goma arábica em 90 ml de uma solução de tris- HCL 50 mM e Ph 8,0.

Substrato de pNPP: Misturar as soluções de A e b(instável).

Solução de Tris-HCL 50 mM: Dissolver 6,057 g de Tris em 1,0 l de água destilada, levar esta solução a pH 8,0 com uma solução de HCL 1M.

Procedimentos:

Colocar 0,15 ml de extrato enzimático em eppendorfs de 2,0 ml;

Fazer um branco para cada amostra, a enzima deve ser termicamente inativada (100° C, 30 min);

Adicionar 1,35 ml do substrato de pNPP em todas as amostras, inclusive brancos, e misturar;

Incubar a temperatura de 37°C por 15 minutos;

Centrifugar a 12000 rpm, por 10 min, à aproximadamente 10°C;

ler a absorbância à 410 nm.

Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de pNPP por minuto.

Obs: Se for necessário diluir o extrato enzimático usar tris- HCL.

Para obter a atividade lipolítica é necessário multiplicar a absorbância por 0,0504. Esse valor de 0,0504 foi obtido através da Lei de Beer, onde já foi calculado o valor do coeficiente de absorvidade molar e corrigido para os volumes de substrato e enzima usados no protocolo. O valor encontrado está em U/ml. Para determinar a atividade específica basta dividir a atividade lipolítica volumétrica pela biomassa.

**Enzymatic Assay of COLLAGENASE using
N-(3-[2-FURYL]ACRYLOYL)-LEU-GLY-PRO-ALA (FALGPA)
as the Substrate**

PRINCIPLE:

FALGPA Collagenase > FAL + Gly-Pro-Ala

Abbreviations used:

FALGPA = N-(3-[2-Furyl]Acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala

FAL = N-(3-[2-Furyl]Acryloyl)-Leu

CONDITIONS: T = 25°C, pH 7.5, A345nm

1, Light path = 1 cm

METHOD: Continuous Spectrophotometric Rate Determination

REAGENTS:

50 mM Tricine Buffer with 10 mM Calcium Chloride and 400 mM Sodium Chloride, pH 7.5 at 25°C (Prepare 500 ml in deionized water using Tricine, Sigma Prod. No. T-0377, Calcium Chloride, Dihydrate, Sigma Prod. No. C-3881, and Sodium Chloride, Sigma Prod. No. S-9625. Adjust to pH 7.5 at 25°C with 1 M NaOH.).

10 mM N-(3-[2-Furyl]Acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala Solution (FALGPA) (Prepare

50 ml in Reagent A using N-(3-[2-Furyl]Acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala, Sigma Prod. No. F-5135. Approximately 30 minutes of stirring is required for this product to dissolve completely. Adjust to pH 7.5 at 25°C with either 1 M NaOH or 1 M HCl.).

Collagenase Enzyme Solution (Immediately before use, prepare a solution containing 2 units/ml of Collagenase in cold deionized water.)

PROCEDURE:

Pipette (in milliliters) the following reagents into suitable cuvettes:

	Test	Blank
Reagent B (FALGPA)	2.90	2.90
Deionized Water	-----	0.10

Mix by inversion and equilibrate to 25°C. Monitor the A_{345nm} until constant, using a suitably the mostattted spectrophotometer. Then add:

	Test	Blank
Reagent C (Enzyme Solution)	0.10	-----

Immediately mix by inversion and record the decrease in A_{345nm} for approximately 5 minutes. Obtain the DA_{345nm/minute} by using the maximum linear rate for both the Test and Blank.

CALCULATION:

(DA_{345nm}/min Test - DA_{345nm}/min Blank)(3)(df)

Units/ml enzyme =

$$\text{Units/ml enzyme} = \frac{(\Delta A_{345\text{nm}}/\text{min Test} - \Delta A_{345\text{nm}}/\text{min Blank})(3)(\text{df})}{(0.53)(0.1)}$$

3 = Total volume (in milliliters) of assay

df = Dilution factor

0.53 = Millimolar extinction coefficient of FALGPA at 345 nm²

0.1 = Volume (in milliliters) of enzyme used

$$\text{Units/mg solid} = \frac{\text{units/ml enzyme}}{\text{mg solid/ml enzyme}}$$

$$\text{Units/mg protein} = \frac{\text{units/ml enzyme}}{\text{mg protein/ml enzyme}}$$

UNIT DEFINITION:

One unit hydrolyzes 1.0 mmole of furylacryloyl-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA, F-5135) per minute at 25°C at pH 7.5 in the presence of calcium ions.

REFERENCE:

Van Wart, H.E., and Steinbrink, D. R. (1981) *Analytical Biochemistry* **113**, 356-365