



APLICAÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS NA DEPILAÇÃO DE PELES BOVINAS

Aline Dettmer¹, Mariliz Gutterres¹, Élita Cavalli¹, Marco A. Z. Ayub²

¹ Lacouro – Laboratório de estudos em Couro e Meio Ambiente

² BiotecLab – Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

R. Eng. Luis Englert, s/n. Campus Central. CEP: 90040-040 - Porto Alegre - RS - BRASIL,

E-MAIL: {alinedet, mariliz}@enq.ufrgs.br

Resumo: A redução do impacto ambiental causado pelo processamento de peles bovinas é algo recorrente, já que este tipo de indústria tem grande importância no Rio Grande do Sul. Neste trabalho propôs-se a substituição total da depilação utilizando cal e sulfeto de sódio pela depilação enzimática. Os resultados obtidos foram satisfatórios, já que em 6 horas de processo foi possível obter peles depiladas de maneira adequada. Além da análise visual, também se realizou a análise da remoção de proteínas interfibrilares e de um eventual ataque das enzimas a flor do couro, através da análise de hidroxiprolina nos banhos. Observou-se um aumento contínuo das quantidades de proteínas interfibrilares no banho, bem como da quantidade de hidroxiprolina. O próximo passo será a comparação, no que diz respeito a estes parâmetros, entre o processo convencional e o processo enzimático.

Palavras-chave: enzimas, proteínas inter-fibrilares, depilação, peles bovinas

1. Introdução

A preocupação com os impactos negativos causados pelo desenvolvimento industrial ganhou maior força, principalmente, a partir dos anos 70. Nesta época, no Brasil, foi criada a Secretaria Especial de Meio Ambiente (SEMA), em resposta à Conferência de Estocolmo de 1972. Ao longo deste período muitas mudanças ocorreram resultantes de uma nova percepção da sociedade quanto à importância da proteção do meio ambiente e vêm influenciando as ações das instituições públicas e privadas. Conforme ANDRADE *et al.* (2010), foi a partir dos anos 90 que os setores produtivos passaram a ter uma nova percepção entre negócios e meio ambiente, expressa através da redução de custos de produção, otimização do uso dos recursos naturais, minimização da geração de resíduos e marketing de produtos e processos mais limpos.

Todavia, de acordo com KEMP e VOLPI (2008), a adoção de novas tecnologias não é instantânea e, quanto mais economicamente atrativa, mais rapidamente ela será adotada por um número maior de companhias. Além disso, tecnologias caras e complexas tendem a se difundir de maneira mais lenta.

As enzimas são substâncias orgânicas, geralmente proteínas, conhecidas como biocatalisadores para múltiplas reações químicas e são exploradas comercialmente nas indústrias de detergentes, alimentos, farmacêuticas, diagnósticos clínicos, química fina, entre outras. Apesar de já estar consolidada em outras atividades industriais, a utilização de enzimas na indústria curtidora ainda tem um

grande caminho a seguir. AQUIM *et al.* (2010) realizaram um levantamento sobre as práticas adotadas pelos curtumes no Rio Grande do Sul, entre elas a utilização de processos ambientalmente mais corretos. Os autores constataram que nenhum dos dez curtumes pesquisados utiliza enzimas na etapa de depilação e que 78 % usam sulfetos nesta etapa, enquanto que apenas 22 % fazem uso conjunto de sulfetos e auxiliares, que contribuem para a redução do uso de sulfetos.

Neste trabalho, a depilação e o caleiro convencionais (com o sistema cal/sulfeto de sódio) foram substituídos por uma etapa de depilação enzimática, sem adição de produtos químicos. O processo foi avaliado quanto à remoção de material interfibrilar (proteoglicanos e glicosaminas) e um possível ataque da enzima ao colágeno da pele foi identificado pela quantificação da hidroxiprolina no banho. As glicosaminas também denominadas mucopolissacarídeos, são carboidratos lineares de peso molecular elevado, formados pela polimerização do ácido urônico e hexosamina (glicosamina ou galactosamina). A glicosamina mais comum é o ácido hialurônico, as demais são: sulfato de condroitina, sulfato de dermatana, queratossulfato e sulfato de heparitina. De acordo com VALEIKA *et al.* (2009), sulfato de dermatana é parcialmente removido durante o processo de caleiro e depilação. Conforme BLC (2009), o sulfato de dermatana removido durante a depilação/caleiro é associado com a abertura da estrutura de fibras. Uma remoção eficiente do sulfato de dermatana resulta em uma estrutura de fibras abertas, facilita a

difusão de insumos químicos de processos subsequentes, produz um couro macio, aumenta sua área, porém a remoção excessiva resulta em um couro solto e fraco.

Os proteoglicanos são proteínas extracelulares ligadas a glicosaminas (estruturas que possuem um dos açúcares aminados e normalmente sulfatados). O principal proteoglicano é a decorina, constituída de uma única cadeia de sulfato de dermatana ligada a uma cadeia polipeptídica. De acordo com RAMOS e LIU (2010), a remoção eficiente dos proteoglicanos da pele é importante para a qualidade do couro, promovendo maciez e flexibilidade. A **Figura 1** apresenta um corte esquemático de uma pele bovina.

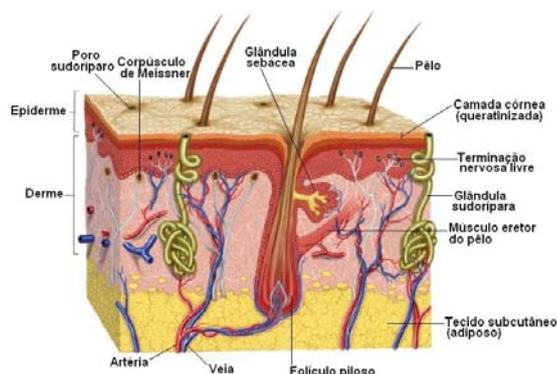


Figura 1. Corte esquemático de uma pele. Fonte: Wikipédia

Com base no trabalho de DETTMER *et al.* 2011, foram isoladas bactérias produtoras de enzimas com possibilidade de aplicação na depilação de peles.

O objetivo deste trabalho foi a definição do melhor tempo de aplicação das enzimas para depilação de peles e posterior avaliação da pele depilada, bem como da remoção das proteínas interfibrilares.

2. Materiais e Métodos

2.1 Isolamento de bactérias produtoras de enzimas proteolíticas

As enzimas utilizadas neste trabalho foram obtidas a partir do isolamento de bactérias do lodo aeróbio da estação de efluente de um curtume, conforme descrito em DETTMER *et al.* (2010).

2.2 Ensaios de aplicação das enzimas nas peles

Para os ensaios de aplicação, uma pele bovina foi adquirida em um curtume parceiro do Lacouro. As enzimas utilizadas foram obtidas após o cultivo da bactéria previamente isolada. O meio de cultivo foi centrifugado para remoção dos microrganismos e o sobrenadante foi utilizado como fonte de enzima.

Realizou-se um ensaio em fulão piloto (Figura 2), para determinação do melhor tempo de processo. Foram cortadas amostras de pele de aproximadamente 200 g e padronizou-se a utilização de 200 unidades enzimáticas (U) para cada grama de pele. O ensaio teve a duração de 12 horas, sendo que uma amostra de pele era retirada a cada 90 minutos de processo, bem como uma amostra do banho para análise. Além disso, também era retirada a quantidade de banho correspondente à massa da amostra de pele retirada, este procedimento foi adotado para manter a relação unidade enzimática por grama de pele. A determinação do tempo ideal de processo baseou-se na

análise de remoção de proteínas interfibrilares, hidroxiprolina e análise/avaliação da depilação/qualidade da pele obtida em microscópio óptico.

Com o intuito de avaliar a possível reutilização das enzimas, a atividade residual das mesmas também foi avaliada.

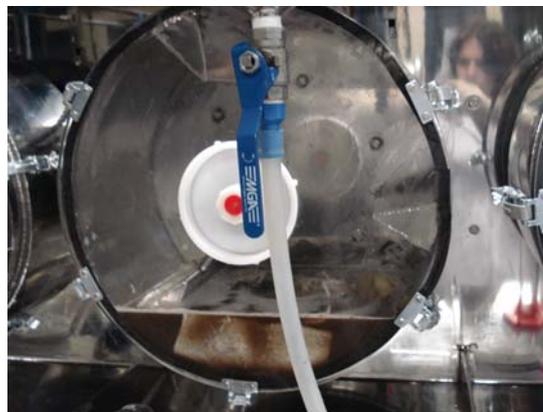


Figura 2. Fulão utilizado para realização dos experimentos

2.3 Determinação de proteínas interfibrilares e hidroxiprolina

A análise da quantidade de proteínas interfibrilares presentes no banho foi realizada conforme método descrito por MADHAN *et al.* (2010). A hidroxiprolina liberada para o banho foi quantificada conforme o método desenvolvido pelo Instituto Filk (Forschungsinstitut für Leder und Kunststoffbahnen, Freiberg, Alemanha, 2009 - trabalho não publicado).

2.4 Planejamento fatorial 2²

Após a determinação do melhor tempo de processo foi realizado um planejamento fatorial 2² para avaliação dos fatores atividade enzimática e rotação do fulão sobre a depilação de peles. Foram testadas atividades enzimáticas de 200 e 100 unidades enzimáticas/grama de pele. A rotação também foi testada em 2 níveis, no nível mais baixo, o fulão permanecia em rotação durante 10 minutos por hora, enquanto no nível alto, a rotação era contínua.

A avaliação foi realizada em função da depilação obtida, com pontuação de 0 a 10, conforme segue abaixo:

- 0 – pelos facilmente removíveis por ação mecânica / pelos não removidos
- 2,5 – pelos facilmente removíveis por ação mecânica / pequenas áreas depiladas
- 5 – pelos facilmente removíveis por ação mecânica / médias áreas depiladas
- 7,5 – pelos facilmente removíveis por ação mecânica / grandes áreas depiladas
- 10 – peles totalmente depiladas

Os experimentos, realizados em duplicata estão apresentados na **Tabela 2**.

3. Resultados e Discussões

3.1 – Determinação do tempo ideal de processo

Os resultados obtidos para a determinação do tempo ideal para o processo de depilação estão apresentados na **Tabela 1** e na **Figura 3**.

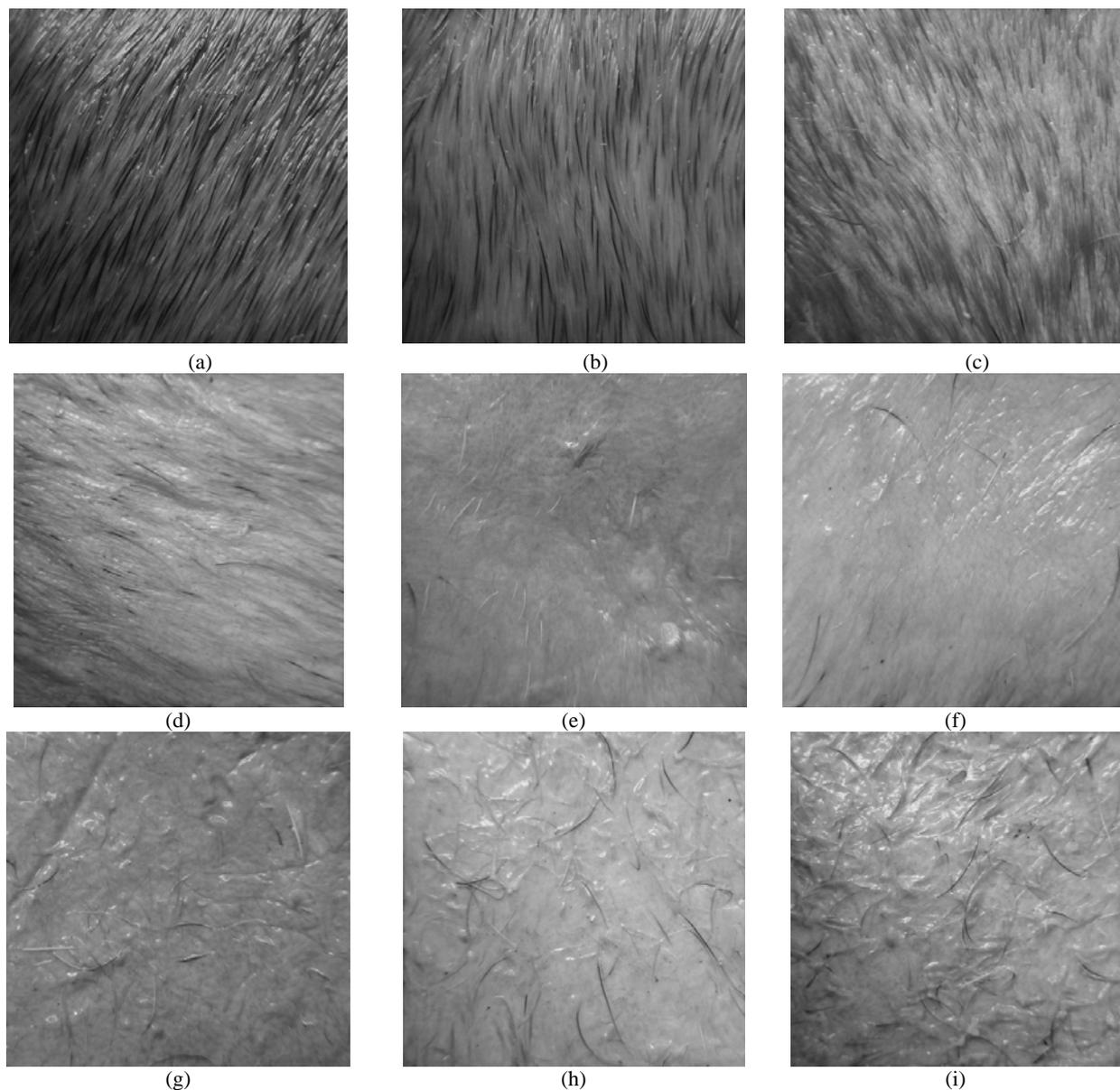


Figura 3. Resultados da microscopia óptica para diferentes tempos de processo. (a) Branco – amostra apenas remolhada, não submetida à ação enzimática. Tempos de processo (b) 90 min; (c) 180min; (d) 270min; (e) 360min; (f) 450 min; (g) 540min; (h) 630 min; (i) 720 min.

A partir das fotografias obtidas em microscópio óptico foi possível observar a evolução do processo de depilação. Na **Figura 3 (a)** está apresentado o branco, sem ação enzimática, a amostra está apenas remolhada. As amostras seguintes foram retiradas com intervalos de 1 hora e 30 minutos. O tempo ideal de processo foi considerado o tempo de 6 horas, **Figura 3 (e)**, pois se obteve uma flor lisa e com raros pelos.

Na amostra que corresponde a 9 horas de processo (Figura 3g) foi possível observar o início da deterioração da flor (camada superior das peles bovinas) das amostras, caracterizados como um aparente pelo encravado. Fato também observado nas análises de hidroxiprolina realizadas nos banhos do processo, pois neste ponto constatou-se um salto na quantidade de hidroxiprolina no banho, aumentando de $8 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ (7,5 horas de processo) para $20 \times 10^{-4} \mu\text{g}$.

Tabela 1. Resultados para proteínas interfibrilares, hidroxiprolina e atividade enzimática residual para diferentes tempos de aplicação das enzimas na pele

| Tempo de processo (h) | Proteoglicanos (mg /g de pele) | Glicosaminas (mg/g de pele) | Hidroxiprolina ($\mu\text{g/g}$ de pele) | Atividade enzimática residual (%) |
|-----------------------|--------------------------------|-----------------------------|---|-----------------------------------|
| 1,5 | $2,2 \times 10^{-4}$ | $0,6 \times 10^{-4}$ | $1,2 \times 10^{-4}$ | 95 |
| 3,0 | $3,3 \times 10^{-4}$ | $1,0 \times 10^{-4}$ | 0,0 | 81 |
| 4,5 | $8,1 \times 10^{-4}$ | $1,3 \times 10^{-4}$ | $2,9 \times 10^{-4}$ | 85 |
| 6,0 | $11,7 \times 10^{-4}$ | $1,6 \times 10^{-4}$ | $4,22 \times 10^{-4}$ | 91 |
| 7,5 | $15,5 \times 10^{-4}$ | $2,2 \times 10^{-4}$ | $7,8 \times 10^{-4}$ | 87 |
| 9,0 | $21,9 \times 10^{-4}$ | $3,0 \times 10^{-4}$ | $20,1 \times 10^{-4}$ | 80 |
| 10,5 | $29,1 \times 10^{-4}$ | $5,7 \times 10^{-4}$ | $24,6 \times 10^{-4}$ | 77 |
| 12 | $42,7 \times 10^{-4}$ | $10,7 \times 10^{-4}$ | $73,7 \times 10^{-4}$ | 80 |

Conforme os dados apresentados na Tabela 1, observa-se que a quantidade de proteoglicanos aumenta com o aumento do tempo de processamento, da mesma forma que as quantidades de glicosaminas e hidroxiprolina também aumentam.

De acordo com BLC (2009), acredita-se que a ação mecânica e a ação das enzimas facilitem a remoção do ácido hialurônico (glicosamina). Os autores também afirmam que as enzimas podem ajudar no processo de abertura ao degradarem a estrutura proteica do sulfato de dermatana (glicosamina ou proteoglicano, caso esteja ligado a cadeias polipeptídicas). Assim, como a ação mecânica era constante e a atividade enzimática residual também foi satisfatória, o aumento da quantidade de proteínas interfibrilares no banho era esperado.

Na próxima etapa do trabalho serão realizados experimentos que compararão o processo de depilação enzimático com o processo convencional que utiliza cal e sulfeto, a partir daí será possível avaliar e comparar a remoção de proteínas interfibrilares em ambos os processos.

Observou-se ainda que a atividade enzimática residual se manteve em valores satisfatórios, o que possibilitaria a reutilização da enzima para um novo processo de depilação.

3.3 Estudo da influência da rotação e da atividade enzimática

Com o objetivo de avaliar a influência da rotação e da atividade enzimática na depilação das peles, realizou-se um planejamento fatorial 2^2 , os resultados estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Planejamento fatorial 2^2

| Exp. | Valores codificados | | Valores Reais | | Resultados Depilação |
|------|---------------------|------------------|---------------|-------------------|----------------------|
| | Rotação (rpm) | A. E. (U/g pele) | Rotação | At. E. (U/g pele) | |
| 1 | 1 | -1 | Contínua | 100 | 5 |
| 2 | -1 | 1 | 10 min/h | 200 | 0 |
| 3 | -1 | -1 | 10 min/h | 100 | 0 |
| 4 | 1 | 1 | Contínua | 200 | 8,75 |

Para a análise da depilação das peles, a Tabela 3 apresenta a análise da variância.

Tabela 3. Tabela anova

| Fatores | SQ | GDL | MQ | F calculado | F tabelado |
|----------------------|--------|-----|--------|-------------|------------|
| Rotação | 112,50 | 1 | 112,50 | 90 | 6,60 |
| Atividade enzimática | 3,13 | 1 | 3,13 | 2,5 | 6,60 |
| Interação | 3,13 | 1 | 3,13 | 2,5 | 6,60 |
| Erro | 6,25 | 5 | 1,25 | - | - |
| Total | 125,00 | 8 | 15,63 | - | - |

Um fator é considerado significativo quando F calculado é maior que o F tabelado. Assim, apenas a rotação foi significativa para a depilação das amostras. Possivelmente o intervalo de valores testados para a atividade enzimática não foi o ideal, deveria ter sido testado um intervalo maior. Todavia, a conclusão a respeito da importância da rotação para o processo de depilação enzimática é fundamental, pois ao contrário do processo convencional, onde a rotação costuma ser de apenas 10 min a cada hora, no processo proposto é essencial que se tenha rotação contínua.

Conforme GALARZA *et al.* (2009), a depilação com a utilização de enzimas proteolíticas provoca a destruição total ou parcial dos tecidos que sustentam os pelos, tais como os componentes da epiderme que circundam o

folículo e a bainha radicular (de maneira mais simples, o revestimento da raiz do pelo). Desta maneira, pode-se concluir que as enzimas causam o afrouxamento do pelo e o atrito entre as peles no fulão causado pela ação mecânica, é responsável pela remoção dos pelos. Isto ficou evidente nos experimentos realizados neste trabalho, pois quando o tempo de rotação do fulão foi de apenas 10 minutos por hora, os pelos eram facilmente removíveis pela utilização de uma espátula. Enquanto, que quando a rotação era contínua, os pelos eram removidos devido ao próprio atrito entre as amostras de peles.

4. Conclusão

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, foi possível determinar o tempo ideal para o processo de depilação enzimática, que foi de 6 horas.

Comprovou-se ainda que a remoção de proteínas interfibrilares aumentou com o tempo de processamento e que a atividade enzimática residual foi satisfatória, o que possibilita a reutilização das enzimas.

Ficou provada ainda a importância da ação mecânica para o caso da utilização da depilação enzimática, pois, as enzimas afrouxam os pelos e a ação mecânica causa a remoção dos mesmos.

Este processo tem como vantagem o menor tempo necessário para a depilação das peles. Além disso, não há a necessidade de realizar a etapa de desencalagem, pois não é adicionada cal durante o processo, logo não é necessário removê-la.

Os próximos experimentos farão uma análise mais detalhada das vantagens e da qualidade da pele obtida com a depilação enzimática.

5. Referências

DETTMER, A.; GUTTERRES, M.; AYUB, M.A.Z. Biotecnologia aplicada ao setor coureiro. In.: IX Oktoberfórum – Seminário do Programa de Pós Graduação em Engenharia Química UFRGS, Porto Alegre, 2010.

ANDRADE, J. C. S.; MARINHO, M. M. O.; KIPERSTOK, A. Uma política nacional de meio ambiente focada na produção limpa: elementos para discussão. Publicação da Rede de Tecnologias Limpas da Bahia – TECLIM, consulta em setembro de 2010.

AQUIM, P.M.; GUTTERRES, M.; TRIERWEILER, J.O. Assessment of water management in tanneries: State of Rio Grande do Sul case study. *J. of the Society of Leather Technol. and Chemists*, v. 94, 253-258, 2010.

BLC – Conferência Internacional com o BLC Leather Technology Centre, maio de 2009, Estância Velha.

GALARZA, B.C.; CAVELLO, I.; GRECO, C.A.; HOURS, R.; SCHULDT, M.M.; CANTERA, C.S., *J. Soc. Leather Technol. Chem.*, **2009**, 94, 26.

KEMP, R.; VOLPI, M. The diffusion of clean technologies: a review with suggestions for future diffusion analysis. *J. of Clean Prod.*, **16S1**, S14-S21, 2008.

MADHAN, B.; DINESHKUMAR, M.; RAO, J.R.; NAIR, B.U., *J. of the American Leather Chemists Association*, **2010**, 105, 145.

RAMOS, M. L. A.; LIU, C.K., J. of the American Leather
Chemists Association, 2010, 105, 222.

VALEIKA, V.; BELESKA, K.; VALEIKIENE, V.;
KOLODZEISKIS V., J. of Clean Prod, 2009, 17, 214.