

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

**DEPILAÇÃO ENZIMÁTICA-OXIDATIVA DE
PELES PARA CURTIMENTO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Eliane Andrioli Matos Marafon

Porto Alegre

2012

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

DEPILAÇÃO ENZIMÁTICA-OXIDATIVA DE PELES PARA CURTIMENTO

Eliane Andrioli Matos Marafon

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

Área de concentração: Pesquisa e desenvolvimento de processos.

Orientadora:
Prof^ª. Dr^ª. Mariliz Gutterres

Porto Alegre

2012

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 *Depilação enzimática-oxidativa de peles para curtimento*, elaborada por Eliane Andrioli Matos Marafon, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Marco A. Z. Ayub

Universidade Federal do Rio Grande do Sul- ICTA, PPGEQ.

Prof^ª. Dr^ª. Aline Dettmer

Universidade de Caxias do Sul – PGEPROTEC.

Prof^ª. Dr^ª. Márcia Schultz

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-
Riograndense e Universidade Federal do Rio Grande do Sul –
DEQUI.

Agradecimentos

Ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, pela estrutura oferecida.

À minha orientadora, professora Mariliz Gutterres, pela orientação e amizade.

Às pessoas mais importantes da minha vida, minha mãe Cita Andrioli Matos e meu esposo Rudimar Marafon, pelo apoio, incentivo, compreensão e paciência em todos os momentos. E a Deus, por tudo.

Aos amigos e familiares que torceram, e torcem, pelo meu sucesso.

Aos amigos do LACOURO e LPR, pela amizade, companheirismo e momentos de descontração. Aos amigos, Míriam Cooper, Soriene Bordignon, Franck Souza, Eduardo Kipper, Wagner F. Fuck e Cláudia Destro dos Santos, por todos os “helps” prestados. À Aline Dettmer e à Érita Cavalli pelo auxílio na parte inicial do trabalho. E à querida amiga e bolsista de iniciação científica Larissa Petry pelo auxílio na realização da parte experimental deste trabalho.

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Resumo

A busca por tecnologias que visem minimizar o impacto ambiental da indústria coureira vem aumentando constantemente. A utilização de enzimas e de produtos oxidantes na etapa de depilação da pele é uma alternativa que permitem a redução do potencial poluidor da indústria do couro, além de possibilitar a redução do tempo de processo. Neste trabalho buscou-se reunir os benefícios do uso de enzimas, produzidas pelo cultivo de duas linhagens de *Bacillus subtilis* (BLBc 11 e BLBc 17), e peróxido de hidrogênio, através da associação destes produtos em um processo de depilação enzimático-oxidativo, alternativo ao processo convencional (cal e sulfeto de sódio). Foram realizados testes iniciais a fim de avaliar as melhores condições de depilação, verificando-se que as melhores condições seriam: realizar a primeira etapa somente com o extrato enzimático, alcalinizar o meio com 1% de hidróxido de sódio e realizar, então, a etapa oxidativa com peróxido de hidrogênio, com o tempo total de processo em torno de 4 h. Os testes de depilação enzimática-oxidativa foram realizados nestas condições, aplicando as enzimas nas concentrações de 100 U g⁻¹ de pele e 300 U g⁻¹ de pele, e o peróxido de hidrogênio nas concentrações de 4 % e 8 %. As peles foram visualmente avaliadas, observando-se que em todos os ensaios os pelos não foram totalmente removidos, conseguindo-se sua remoção com posterior raspagem mecânica. Os pelos foram removidos intactos, com a raiz. Foram realizados testes comparativos entre o método de depilação proposto, a depilação convencional e a depilação puramente enzimática. Os banhos residuais foram avaliados através de análises de pH, nitrogênio total Kjeldhal, sólidos dissolvidos totais, fixos e voláteis, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e hidroxiprolina. Os resultados foram satisfatórios, mostrando que o método de depilação com o uso de enzimas e peróxido de hidrogênio pode ser considerado uma alternativa viável ao uso de cal e sulfeto de sódio.

Palavras-chave: depilação, pelos, pele, enzimas, *Bacillus subtilis*, peróxido de hidrogênio.

Abstract

The search for technologies aiming at minimizing the environmental impact of leather industry is constantly increasing. The use of enzymes and oxidants in the unhairing step is an alternative which allow reducing the pollution of the leather industry, in addition to enabling the reduction of process time. In this study we sought to bring together the benefits of using enzymes, produced by two strains of *Bacillus subtilis* (BLBc 11 e BLBc 17), and hydrogen peroxide through the combination of these products in an enzymatic-oxidative unhairing, alternative to the conventional process (lime and sodium sulfide). Initially, tests were carried out to assess the best conditions for hair removal, verifying that the best conditions are: perform the first step only with the enzymatic extract liquid, alkalization with 1% sodium hydroxide and, then, the oxidation step with hydrogen peroxide, with the total process time around 4 h. Tests for enzyme-oxidative unhairing were performed under these conditions, applying enzymes at concentrations of 100 U g⁻¹ of skin and 300 U g⁻¹ of skin, and hydrogen peroxide at concentrations of 4% and 8%. The skins were visually evaluated, observing that in all the tests the hairs were not completely removed, achieving its removal with subsequent mechanical scraping. The hairs were removed intact, with the roots. Tests were conducted comparing the proposed unhairing method, the conventional unhairing and purely enzymatic unhairing performed with enzymatic extract produced by strains BLBc 11 and BLBc 17. The residual baths were evaluated through analysis of pH, total Kjeldhal nitrogen, total dissolved solids, fixed and volatile, glycosaminoglycans, proteoglycans and hydroxyproline. The results were satisfactory, showing that the enzymatic-oxidative unhairing using enzymes and hydrogen peroxide proposed here can be considered a viable alternative to the use of lime and sodium sulfide.

Keywords: unhairing, hair, skin, enzymes, *Bacillus subtilis*, hydrogen peroxide.

Sumário

Introdução	1
1.1 Objetivos do trabalho	4
1.2 Estrutura do trabalho	4
Revisão bibliográfica.....	7
2.1 Pele	7
2.2 Composição química da pele.....	10
2.3 Processamento de peles em couro	15
2.4 Geração de resíduos em curtumes	22
2.5 Enzimas	24
2.6 Produtos oxidantes e peróxido de hidrogênio	26
2.7 Aplicação de enzimas e produtos químicos oxidantes na indústria do couro (depilação)	27
2.8 Depilação oxidativa com peróxido de hidrogênio (mecanismo) e imunização dos pelos	33
2.9 Depilação enzimática (mecanismo).....	35
2.10 Avaliação da ação enzimática e oxidativa na depilação de peles.....	36
Materiais e Métodos.....	39
3.1 Pele	39
3.2 Enzimas	41
3.3 Testes de depilação.....	42
3.3.1 Imunização, alcalinização e ordem das etapas (enzimática/oxidativa) ...	44
3.3.2 Determinação da concentração de NaOH.....	46
3.3.3 Procedimento experimental – depilação enzimática-oxidativa	47
3.4 Métodos analíticos.....	49
Resultados e Discussão.....	53
4.1 Avaliação das peles	53
4.1.1 Imunização, alcalinização e ordem das etapas (enzimática/oxidativa) ...	53
4.1.2 Determinação da concentração de NaOH.....	55
4.1.3 Procedimento experimental – depilação enzimática-oxidativa	58
4.1.4 Depilação com cal e sulfeto de sódio	67
4.1.5 Depilação enzimática.....	69
4.2 Resultados analíticos	72
4.3 Limitações do trabalho	80

Conclusões	81
5.1 Conclusões.....	81
5.2 Sugestões para trabalhos futuros	83
Referências bibliográficas	85
Apêndice A	95
Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	xii

Lista de figuras

- Figura 1.** Esquema de um corte de pele. Fonte: Reed, 1996..... 8
- Figura 2.** Imagens de pelos após depilação: (a) sulfeto de sódio, (b) processo co-enzimático. Fonte: Souza e Guterres (2012) 17
- Figura 3.** Esquema de uma pele bovina. (a) Principais regiões; (b) Pele dividida em duas metades. Fonte: Souza (2010)..... 40
- Figura 4.** Fotografias da pele utilizada nos testes 40
- Figura 5.** Cultivo em placa das linhagens de *Bacillus subtilis*. (a) BLBc 11; (b) BLBc 17 41
- Figura 6.** Bateria de fulões utilizado nos experimentos 43
- Figura 7.** Análise visual das peles ao final dos experimentos onde foram avaliados a imunização com Ca(OH)_2 , a alcalinização com NaOH e a ordem das etapas (oxidativa/enzimática). (a) Teste 1: sem imunização, alcalinização com NaOH , primeira etapa oxidativa; (b) Teste 2: sem imunização, alcalinização com NaOH , primeira etapa enzimática; (c) Teste 3: imunização com Ca(OH)_2 , sem alcalinização, primeira etapa oxidativa; (d) Teste 4: imunização com Ca(OH)_2 , sem alcalinização, primeira etapa enzimática. 54
- Figura 8.** Análise visual das peles após remoção mecânica dos pelos (raspagem). (a) Teste 1: sem imunização, alcalinização com NaOH , primeira etapa oxidativa; (b) Teste 2: sem imunização, alcalinização com NaOH , primeira etapa enzimática; (c) Teste 3: imunização com Ca(OH)_2 , sem alcalinização, primeira etapa oxidativa; (d) Teste 4: imunização com Ca(OH)_2 , sem alcalinização, primeira etapa enzimática.. 55
- Figura 9.** Peles ao final dos experimentos onde foram avaliados o uso de extrato enzimático como primeira etapa, a concentração de NaOH e a concentração de H_2O_2 . (a) Teste 1: concentração de enzima 100 U g^{-1} de pele; concentração de peróxido de hidrogênio: 4% (concentração mais baixa); (b) Teste 2: concentração de enzima: 300 U g^{-1} de pele; concentração de peróxido de hidrogênio 8% (concentração mais alta).56
- Figura 10.** Resultados dos experimentos onde foram avaliados o uso de extrato enzimático como primeira etapa, a concentração de NaOH e a concentração de H_2O_2 . (a) Verificação da soltura dos pelos; (b) Facilidade de remoção dos pelos por ação mecânica (raspagem); (c) pelos são removidos inteiros; (d) pele limpa..... 57

Figura 11. Resultados dos experimentos onde foram avaliadas as concentrações de enzima, de H₂O₂ e de NaOH. (a) Teste 1: concentração de enzima 100 U g⁻¹ de pele, e 4% de H₂O₂; (b) Teste 2: concentração de enzima 100 U g⁻¹ de pele, e 8% de H₂O₂; (c) Teste 3: concentração de enzima 300 U g⁻¹ de pele, e 4% de H₂O₂; (d) Teste 4: concentração de enzima 300 U g⁻¹ de pele, e 8% de H₂O₂ **58**

Figura 12. Análise visual das peles ao final dos testes, com uso de enzimas produzidas pela linhagem BLBc 11. (a) Teste 1: concentração de enzima 100 U g⁻¹ de pele, e 4% de H₂O₂; (b) Teste 2: concentração de enzima 100 U g⁻¹ de pele, e 8% de H₂O₂; (c) Teste 3: concentração de enzima 300 U g⁻¹ de pele, e 4% de H₂O₂; (d) Teste 4: concentração de enzima 300 U g⁻¹ de pele, e 8% de H₂O₂..... **59**

Figura 13. Imagem das peles após remoção mecânica dos pelos. (a) Teste 1: concentração de enzima 100 U g⁻¹ de pele, e 4% de H₂O₂; (b) Teste 2: concentração de enzima 100 U g⁻¹ de pele, e 8% de H₂O₂; (c) Teste 3: concentração de enzima 300 U g⁻¹ de pele, e 4% de H₂O₂; (d) Teste 4: concentração de enzima 300 U g⁻¹ de pele, e 8% de H₂O₂ **60**

Figura 14. Ampliação das peles após remoção mecânica dos pelos (12 vezes). (a) Teste 1: concentração de enzima 100 U g⁻¹ de pele, e 4% de H₂O₂; (b) Teste 2: concentração de enzima 100 U g⁻¹ de pele, e 8% de H₂O₂; (c) Teste 3: concentração de enzima 300 U g⁻¹ de pele, e 4% de H₂O₂; (d) Teste 4: concentração de enzima 300 U g⁻¹ de pele, e 8% de H₂O₂..... **61**

Figura 15. Pelos inteiros removidos pelo processo enzimático-oxidativo de depilação. Etapa enzimática: enzimas produzidas pela linhagem BLBc 11 **62**

Figura 16. Análise visual das peles ao final dos testes, com uso de enzimas produzidas pela linhagem BLBc 17. (a) Teste 1: concentração de enzima 100 U g⁻¹ de pele, e 4% de H₂O₂; (b) Teste 2: concentração de enzima 100 U g⁻¹ de pele, e 8% de H₂O₂; (c) Teste 3: concentração de enzima 300 U g⁻¹ de pele, e 4% de H₂O₂; (d) Teste 4: concentração de enzima 300 U g⁻¹ de pele, e 8% de H₂O₂..... **63**

Figura 17. Análise visual das peles após remoção mecânica dos pelos. (a) Teste 1: concentração de enzima 100 U g⁻¹ de pele, e 4% de H₂O₂; (b) Teste 2: concentração de enzima 100 U g⁻¹ de pele, e 8% de H₂O₂; (c) Teste 3: concentração de enzima 300 U g⁻¹ de pele, e 4% de H₂O₂; (d) Teste 4: concentração de enzima 300 U g⁻¹ de pele, e 8% de H₂O₂ **64**

Figura 18. Ampliação das peles após remoção mecânica dos pelos (12 vezes). (a) Teste 1: concentração de enzima 100 U g⁻¹ de pele, e 4% de H₂O₂; (b) Teste 2: concentração de enzima 100 U g⁻¹ de pele, e 8% de H₂O₂; (c) Teste 3: concentração de enzima 300 U g⁻¹ de pele, e 4% de H₂O₂; (d) Teste 4: concentração de enzima 300 U g⁻¹ de pele, e 8% de H₂O₂..... **65**

Figura 19. Pelos removidos inteiramente pelo processo de depilação enzimática-oxidativa. Etapa enzimática: enzimas produzidas pela linhagem BLBc 17..... **66**

Figura 20. Análise visual das peles depiladas pelo sistema cal/sulfeto de sódio. (a) Peles ao final do processo; (b) e (c) Peles visualizadas com ampliação de 12 vezes.	68
Figura 21. Depilação enzimática com enzimas produzidas pelo cultivo de BLBc 11. (a) Análise visual após a depilação; (b) análise visual após remoção física dos pelos; (c) e (d) Peles depiladas com ampliação de 12 vezes	70
Figura 22. Análise visual da depilação enzimática com enzimas produzidas por BLBc 17. (a) Análise visual ao final da depilação; (b) Análise visual após remoção física dos pelos; (c) e (d) Avaliação com aumento de 12 vezes.....	71
Figura 23. Gráfico comparativo da análise de pH nos banhos residuais dos ensaios de depilação.....	73
Figura 24. Resultados comparativos das análises de SDT, SDF e SDV nos banhos residuais dos ensaios de depilação	74
Figura 25. Resultados comparativos das análises de glicosaminoglicanos e proteoglicanos nos banhos residuais dos ensaios de depilação.....	75
Figura 26. Resultados comparativos das análises de hidroxiprolina nos banhos residuais dos ensaios de depilação	77
Figura 27. Resultados comparativos das análises de nitrogênio total (NTK) nos banhos residuais dos ensaios de depilação.....	78

Lista de tabelas

Tabela 1. Formulação utilizada nas etapas de lavagem e remolho	43
Tabela 2. Formulações utilizadas na primeira batelada de testes.....	45
Tabela 3. Formulação utilizada na segunda batelada de testes	46
Tabela 4. Formulação utilizada na terceira batelada de testes	47
Tabela 5. Formulação utilizada nos ensaios de depilação.....	48
Tabela 6. Formulação utilizada na depilação com cal e sulfeto de sódio	49
Tabela A.1. Resultados das análises de sólidos dissolvidos totais, fixos e voláteis, nitrogênio total Kjeldahl (NTK), glicosaminoglicanos, proteoglicanos, hidroxiprolina e pH nos banhos residuais	96

Capítulo 1

Introdução

A manufatura de couros é uma das indústrias mais antigas, e também uma das mais conhecidas por seu impacto ambiental. Do ponto de vista industrial e ambiental, o curtume sempre foi visto como um dos mais contaminantes, já que os processos produtivos geram uma elevada quantidade de resíduos sólidos, líquidos e gasosos, além da geração de odores desagradáveis.

Sabe-se que o processamento de couros envolve 3 fases principais (ribeira, curtimento e acabamento), subdivididas em várias etapas. As operações de ribeira têm como principal função deixar a pele limpa e pronta para as etapas subsequentes. No entanto, os processos de ribeira, realizados no modo convencional, são responsáveis pelo descarte da maior parte da poluição total gerada pelo processamento do couro. Na etapa de depilação e caleiro, onde os principais produtos químicos utilizados são o sulfeto de sódio e a cal, a presença de grandes quantidades destes nas águas residuais resulta em altos teores de sulfetos (S^{2-}) e sólidos em suspensão (SS) nos efluentes. Este processo também é responsável por 60% - 70% da carga poluidora gerada pelo curtume, em termos da demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO_5) (LI *et al.*, 2010). De acordo com Jian *et al.* (2011), o processo convencional de depilação (cal-sulfeto de sódio), permite a destruição do pelo, causando emissões com elevada demanda química de oxigênio (DQO), demanda biológica de oxigênio (DBO) e sólidos totais suspensos.

Além de conhecidos pelo seu impacto ambiental, os curtumes também não possuem uma boa reputação com relação à geração de odores. Os odores gerados pelos curtumes

podem ter natureza e origens variadas, sendo que o mais marcante e característico é o odor gerado por compostos de enxofre (H_2S e mercaptanos), proveniente majoritariamente dos processos de depilação e caleiro. Além do odor desagradável, a presença de H_2S é perigosa, pois com o aumento da concentração, sua percepção diminui e a toxicidade aumenta, podendo chegar a ser letal (TOULOUMET, 2011). Em janeiro de 2012, em um curtume de Mato Grosso do Sul, um acidente relacionado à geração de gás tóxico (H_2S) ocasionou a morte de quatro pessoas e deixou 28 pessoas intoxicadas. Durante a descarga de ácido propiônico, ocorreu uma violenta reação química com a geração de um grande volume de gás tóxico (H_2S). Provavelmente, durante a transferência do ácido do caminhão para o tanque, houve reação deste ácido com sulfetos, acarretando na geração de um grande volume de gás sulfídrico (disponível em g1.globo.com).

Apesar do impacto ambiental, a indústria do couro tem um papel importante nas regiões onde está inserida. O Brasil é um dos grandes produtores mundiais de couro. Estima-se que em 2011 a produção mundial de couros tenha atingido o número de 311 milhões de unidades, sendo o Brasil responsável pela produção de 43 milhões de couros, o que representa 13,8% da produção mundial. O Rio Grande do Sul possui o maior número de estabelecimentos de curtimento e outras preparações de couros, 224 em 2011, gerando mais de 13.500 empregos neste Estado (GUIA BRASILEIRO DO COURO, 2012).

Verifica-se, portanto, a necessidade da implantação de tecnologias mais limpas, com a substituição de reagentes potencialmente perigosos, por produtos mais brandos e mais facilmente tratados nas estações de tratamento.

O uso de produtos a base de enzimas está sendo explorado em muitas áreas do processamento do couro. Além disso, as enzimas estão ganhando mais importância no processo de depilação, eliminando a necessidade do uso de sulfeto de sódio. O uso de enzimas no remolho diminui o tempo de processo e inicia o processo de abertura das fibras. Na etapa de depilação/caleiro, as enzimas podem ser utilizadas em associação com menores quantidades de sulfeto de sódio e cal, e na purga, o uso de enzimas tem com principal função remover as proteínas coaguláveis da pele (THANIKAIVELAN *et al.*, 2004).

Diversos autores, como Crispim e Mota (2003), Sivasubramanian *et al.* (2008a e 2008b), Dettmer *et al.* (2012a, 2012b e 2012c), por exemplo, vêm estudando a aplicação de enzimas na etapa de depilação como alternativa ao uso de cal e sulfeto de sódio.

De acordo com Valeika *et al.* (2009), o uso de enzimas é o mais promissor dos métodos para a redução do impacto ambiental causado pelo processamento do couro. O uso

de enzimas na etapa de depilação/caleiro permite, em um curto espaço de tempo, diminuir a quantidade de produtos químicos e produzir peles uma camada flor limpa. Além disso, as enzimas podem ser utilizadas em um processo de depilação com recuperação do pelo (*hair saving*), onde estas enzimas atacam as ligações entre o pelo e a derme, levando à soltura do pelo.

Proteases microbianas estão entre as mais importantes enzimas hidrolíticas e vêm sendo estudadas extensivamente desde o advento da enzimologia. Proteases alcalinas produzidas por bactérias encontram inúmeras aplicações em vários setores da indústria. Na indústria do couro, o tratamento enzimático destrói pigmentos indesejáveis, aumenta a área de pele e produz peles mais limpas. As proteases alcalinas aumentam a velocidade da depilação, pois as condições alcalinas permitem o inchamento das raízes dos pelos e o subsequente ataque das proteases às proteínas do folículo do pelo, permitindo a fácil remoção deste (GUPTA *et al.*, 2002).

Outra alternativa ao uso de cal e sulfeto de sódio é o uso de produtos oxidantes na depilação de peles. Os produtos oxidantes podem promover uma rápida reação de depilação, que em termos econômicos pode trazer vantagens aos curtumes, além de permitirem a substituição completa ou parcial de sulfeto de sódio nesta etapa.

Assim como o uso de enzimas, o uso de produtos oxidantes como substituintes do sulfeto de sódio na etapa de depilação também é foco de estudo para diversos autores. Marsal *et al.* (1999), Marmer *et al.* (2003), Bronco *et al.* (2005) e Morera *et al.* (2008), avaliaram o uso de peróxido de hidrogênio, Marmer e Dudley (2008) estudaram a depilação oxidativa com percarbonato de sódio, e Gehring *et al.* (2003) avaliaram o peróxido de cálcio. Sendo que todos os estudos citados apresentaram resultados satisfatórios.

A aplicação da depilação oxidativa com recuperação do pelo permite a substituição do sulfeto de sódio e a redução da carga de poluentes nas águas residuais. Recentemente, está sendo dada mais atenção à depilação oxidativa com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), devido ao fato de que ela pode reduzir notavelmente o impacto ambiental (SHI *et al.*, 2003). Muitos estudos estão sendo realizados para avaliar as possibilidades do uso de peróxido de hidrogênio em meio alcalino. Embora os resultados obtidos por este método de depilação sejam satisfatórios, ele causa a destruição dos pelos, resultando na contaminação do efluente. Neste caso, seria necessária a proteção do pelo contra a ação subsequente do H₂O₂ em meio alcalino. Um sistema de depilação com recuperação do pelo poderia ser realizada com a imunização com 1% de hidróxido de cálcio, previamente à depilação com H₂O₂. Contudo não é

conveniente alcançar a imunização total, pois isto poderá tornar impossível a remoção dos pelos (MARSAL *et al.*, 2002 e SHI *et al.*, 2003). Tanto o sulfeto de sódio quanto o peróxido de hidrogênio agem em condições altamente alcalinas, entretanto, o sulfeto de sódio age como um agente redutor, enquanto o peróxido de hidrogênio atua como um oxidante, decompondo-se e transformando-se em água, gerando assim efluentes menos poluentes (MORERA *et al.*, 2006).

Assim, propõe-se o uso combinado de enzimas com processo oxidativo, visando diminuir o tempo do processo puramente enzimático estudado por Dettmer (2012) e Dettmer *et al.* (2012a, 2012b e 2012c). Os autores isolaram e selecionaram, a partir do lodo de estação de tratamento de um curtume, duas linhagens de *Bacillus subtilis* produtoras de proteases, denominadas BLBc 11, selecionada por apresentar menor efeito sobre o colágeno, e BLBc 17, selecionada por apresentar maior efeito sobre a queratina. As enzimas produzidas por estas duas linhagens, foram aplicadas em um processo de depilação puramente enzimático, onde os autores obtiveram resultados satisfatórios em um processo de 6 horas. Assim, o processo combinado destas mesmas enzimas (BLBc 11 e BLBc 17) com o peróxido de hidrogênio, proposto neste trabalho, visa um processo sem destruição do pelo, assim como o processo puramente enzimático, porém com um tempo de processo de aproximadamente 4 horas.

1.1 Objetivos do trabalho

O objetivo deste trabalho é avaliar o uso associado de enzimas (proteases), produzidas por linhagens de *Bacillus subtilis*, denominadas BLBc 11 e BLBc 17, e peróxido de hidrogênio. Ou seja, associar os benefícios do uso de enzimas e de peróxido de hidrogênio através de um processo de depilação enzimático-oxidativo, com o uso de produtos menos agressivos ao meio ambiente. O método de depilação estudado neste trabalho visa a não destruição do pelo e a redução do tempo de processo, tanto comparado ao processo convencional com uso de cal e sulfeto de sódio quanto comparado ao processo enzimático.

1.2 Estrutura do trabalho

O presente trabalho está estruturado em 5 capítulos.

No capítulo 2 será apresentada uma revisão bibliográfica sobre a estrutura das peles, bem como uma apresentação das etapas do processamento que transforma pele em couro. A

etapa de depilação/caleiro será abordada com maior aprofundamento, por ser o foco desta dissertação. Também serão abordados alguns conceitos na área biotecnológica, principalmente na produção e caracterização de enzimas. A utilização de enzimas, bem como o uso de produtos oxidantes, na depilação de peles, como possíveis alternativas à substituição do sulfeto de sódio nesta etapa, também serão assuntos abordados neste capítulo.

No capítulo 3 serão descritas as etapas envolvidas na realização dos experimentos. Serão apresentados os materiais e as formulações utilizadas nos ensaios e, por fim, os métodos de análises utilizados para a avaliação dos testes.

No capítulo 4 serão apresentados os resultados obtidos e suas discussões. Serão discutidos os resultados das análises visuais das peles e dos pelos removidos, realizados para verificar se o método enzimático-oxidativo proposto não degrada os pelos. Em seguida serão apresentados, também, os resultados analíticos obtidos pela análise dos banhos.

No capítulo 5 serão apresentadas as conclusões e sugestões para futuros trabalhos.

Capítulo 2

Revisão bibliográfica

Neste capítulo é feita a revisão bibliográfica sobre a estrutura das peles, matéria-prima da indústria do couro, com a apresentação das etapas do processamento que transforma pele em couro. A etapa de depilação/caleiro será abordada com maior aprofundamento, por ser o foco desta dissertação. É feita, também, uma apresentação de alguns conceitos na área biotecnológica, principalmente na produção e caracterização de enzimas. A utilização de enzimas, bem como o uso de produtos oxidantes, na depilação de peles, como possíveis alternativas à substituição do sulfeto de sódio nesta etapa, também serão assuntos abordados.

2.1 Pele

Sendo a pele a matéria-prima da indústria do couro, é necessário conhecer sua estrutura, zonas e camadas que a compõem. Dá-se o nome de pele à camada protéica que reveste o corpo dos animais superiores. A pele é, geralmente, coberta por pelos ou lã para conferir-lhes proteção a agentes externos. A maior quantidade de peles usadas para a manufatura de couros é proveniente de bovinos, caprinos, suínos e ovinos.

A estrutura histológica de peles de animais destinadas à fabricação de couros é bem conhecida. Há peculiaridades fundamentais na constituição da pele. Estas variam de acordo com as raças e espécies animais. As peles dos mamíferos são formadas por três camadas: a camada superior (externa) é chamada epiderme, a camada intermediária é derme, ou *córium* (*cútis*) e a camada inferior é a hipoderme ou *subcutis*. As camadas da pele têm

desenvolvimento, construção, constituição química e funções fisiológicas diferenciadas entre si (GUTTERRES, 2004). A epiderme é, basicamente, queratina, a derme é composta por fibras de colagênio e a hipoderme, principalmente formada por gorduras.

A estrutura da pele é verificada na Figura 1, onde se podem verificar as camadas da pele a partir de um corte.

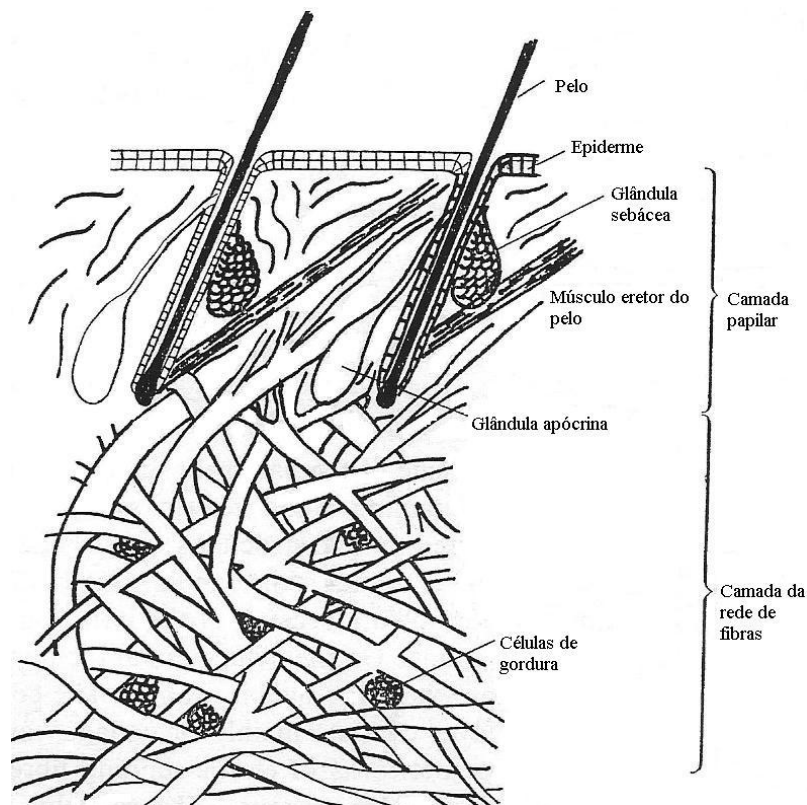


Figura 1. Esquema de um corte de pele

Fonte: Reed, 1996.

Epiderme

A epiderme constitui a camada mais externa, contribuindo com praticamente 1% para a espessura total da pele. A camada epidérmica, que apresenta como constituinte principal a queratina, é destruída, ou apenas liberada da camada subjacente, na etapa de depilação, dependendo do sistema empregado (HOINACKI *et al.*, 1994). A epiderme contém melanócitos e células imunitárias. Os anexos cutâneos (pelos, folículo piloso, glândulas sebáceas e sudoríparas) também estão presentes nas peles dos mamíferos, estendendo-se até a

derme. A junção entre a epiderme e a 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 (SOUZA, 2010).

Além das queratinas, outras substâncias desempenham papel muito importante na impermeabilização e consistência física da epiderme. O espaço intercelular das subcamadas da epiderme é preenchido por uma secreção rica em glicolipídeos e esteróis, que criam uma barreira à prova d'água na epiderme. Além dessa secreção, as células da epiderme estão interconectadas por desmossomos: glicoproteínas especializadas na função de conectar célula (SOUSA, 2006).

Da fora para dentro, a epiderme é constituída pelas seguintes camadas: camada córnea, camada granular e camada mucosa de Malpighi ou camada basal (GUTTERRES, 2010). A camada de Malpighi contém células de aparência gelatinosa e baixa resistência, que são facilmente atacadas por bactérias e álcalis. Os pelos e a melanina, responsável pela sua coloração, tem origem na camada de Malpighi.

O pelo é uma importante produção epidérmica. A raiz do pelo está contida no folículo piloso e termina em uma porção dilatada, denominada bulbo, o qual tem uma concavidade conhecida como papila. As células epiteliais que cobrem o folículo piloso recebem alimentação da derme por intermédio da papila. A base do pelo quase chega ao fundo da camada papilar. O pelo compõe-se de duas partes contínuas, a raiz e o talo. A maioria dos pelos está disposta obliquamente em relação à superfície da pele (GUTTERRES, 2010).

O processo pelo qual a queratina é formada no pelo e na camada córnea da epiderme é chamado queratinização. Basicamente, o processo consiste na formação de pontes dissulfeto a partir dos grupos tiol (-SH). Durante a queratinização, o córtex é enriquecido com cistina e metionina, formando um pelo com grande estabilidade, força e propriedades fibrosas com relação à epiderme e a raiz do pelo. A queratina do córtex é chamada queratina dura (*hard*) e a da epiderme e raiz do pelo é chamada de queratina macia (*soft*) (GALARZA *et al.*, 2009; DETTMER, 2012).

Derme

É a parte principal da pele, já que é a parte aproveitável para a fabricação do couro. Os couros são obtidos desta camada, após a eliminação das demais camadas constitutivas da pele, ao longo do processamento. A derme está constituída pelas camadas papilar e reticular. A camada papilar fica exposta, após a etapa de depilação, e é denominada pelos curtidores de **camada flor** (HOINACKI *et al.* 1994).

A derme é formada por um tecido tridimensional de fibras de proteína do colagênio. O colagênio é o principal constituinte dos tecidos animais (GUTTERRES, 2004; HOFMAN, 2011).

O *córium* (derme) é a camada que interessa para o curtidor e representa 85% da espessura da pele bovina. Apenas o *córium* será transformado em couro após a remoção da epiderme e hipoderme e de constituintes como pelos, glândulas, gorduras, sangue, sujeiras e sal de conservação (GUTTERRES, 2004).

Hipoderme

Esta camada constitui aproximadamente 15% da espessura total da pele e elimina-se mecanicamente na ribeira mediante a operação de descarne. É a parte da pele que assegura a união com o corpo do animal. É constituída por fibras largas dispostas paralelamente à superfície da pele. Entre suas fibras encontram-se células graxas, vasos sanguíneos grossos e nervos (GUTTERRES, 2010).

2.2 Composição química da pele

A pele fresca é formada por um reticulado de proteínas fibrosas embebidas por um líquido aquoso que contém proteínas globulares, graxas e substâncias minerais e orgânicas. A composição aproximada de uma pele fresca é a seguinte: 60 – 64% de água, 33% de proteínas, 2 – 6% de gorduras, 0,5% de substâncias minerais e 0,5% de outras substâncias. Entre estes valores, destaca-se o elevado conteúdo de água da pele. Do total de proteínas que tem a pele aproximadamente, 94 – 95% é colagênio, 1% elastina, 1 – 2% queratina e o resto são proteínas não fibrosas (GUTTERRES, 2004).

Elastina

A elastina é uma proteína fibrosa que ocorre ao longo do colagênio, contribuindo com um considerável grau de elasticidade ao tecido conjuntivo. A elastina é um objeto de grande interesse devido a sua específica resistência química e física. É caracterizada pelo alto conteúdo de aminoácidos não polares: glicina, alanina, prolina e valina, e baixo teor notável de aminoácidos polares, como lisina, histidina e arginina. Na elastina pura carboidratos são ausentes. A função biológica da elastina é principalmente a de ligamento. As fibras de elastina evitam danificações ou estiramento excessivo das ligações. As propriedades elásticas da elastina são restritas ao estado completamente hidratado. A elastina seca torna-se frágil (BIENKIEWICZ, 1983; HEIDEMANN, 1993).

Segundo Heidemann (1993), para a manufatura do couro, o especial comportamento das fibras de elastina tem um interessante e importante efeito. As fibras de elastina resistem à quebra durante os processos de caleiro e purga, bem como a todos os outros processos até obtenção do couro acabado. A presença de redes de elastina limita a elasticidade do couro e é essencial para um couro de flor firme.

Queratinas

As queratinas são proteínas fibrosas, insolúveis em água, soluções salinas neutras, soluções de ácidos fracos e álcalis fracos, além de ser altamente resistentes à hidrólise enzimática. Essas propriedades podem ser explicadas pela estabilidade da estrutura terciária da queratina conferida especialmente pelas ligações dissulfídicas dos aminoácidos da cisteína. Dois aminoácidos cisteína se unem através de uma ligação dissulfídica, formando um novo aminoácido, a cistina. Existem queratinas *soft* (macias) e *hard* (duras). As primeiras possuem aminoácidos cisteína, que não se uniram para formar as pontes dissulfídicas. Já as queratinas *hard* possuem praticamente todo o enxofre na forma de cistina, ou seja, formando ligações dissulfídicas. Essa diferença no número de ligações dissulfídicas por molécula é que confere às queratinas diferentes graus de resistência a ataques químicos e enzimáticos (SOUSA, 2006).

As queratinas consistem em uma mistura de proteínas, cada uma com uma composição diferente, sendo que o grupo principal consiste em proteínas insolúveis, cuja insolubilidade é devida à cisteína. Os conteúdos de glicina e prolina na queratina são bem inferiores do que no

colagênio. Uma característica da cisteína é a facilidade com que ela forma pontes de enxofre, formando assim a cistina. Queratinas com maior conteúdo de cistina são mais resistentes ao ataque de enzimas (BIENKIEWICZ, 1983). É característica da queratina o teor de enxofre entre 3 – 5%, devido às ligações de enxofre na cistina (BASF, 2004).

Colagênio

O termo “colagênio” vem do grego, da palavra cola, e foi descrito inicialmente como o constituinte conectivo de tecidos/pele, que se torna gelatina quando aquecido. Cada cadeia polipeptídica de colagênio contém mais de 1000 resíduos de aminoácidos (MANCOPES *et al.*, 2008).

O colagênio é conhecido não como uma simples substância, mas por uma família de substâncias. São conhecidos quase 30 tipos de colagênio, que diferem em alguns casos consideravelmente em suas características químicas e estruturais, de acordo com suas funções nos organismos vivos. Uma característica comum é sua conformação em tríplice-hélice, seu teor de hidroxiprolina, um aminoácido específico do colagênio, e sua ocorrência na matriz extracelular (REICH, 2007). O colagênio é a principal proteína do corpo dos animais. Representa até 30% do total de proteínas dos mamíferos (GUTTERRES, 2004). A variedade do colagênio é função da combinação de domínios em hélice tripla com domínios não helicoidais. Todos os tipos de colagênio têm papéis importantes na formação de fibrilas durante o crescimento de tecido conjuntivo e em outros processos vivos. São todos componentes da matriz extracelular. Apesar de existirem apenas em pequenas quantidades, são de grande importância biológica (GUTTERRES, 2004).

De acordo com Reich (2007), os tipos de colagênio nas peles de animais são: tipo I (formadores de fibrilas, crescimento prolongando-se a fibras e rede de fibras); tipos III, V (formam finas fibrilas, fibras e feixes de fibras); tipos IV, VII (filamentosos tipo IV não fibrilar); tipo VI (filamentosos).

Segundo Gutterres (2004), as peles são essencialmente constituídas de colagênio tipo I e pequenas quantidades dos tipos III, V, IV e IV. O tipo I é o mais abundante em termos de massa do corpo de animais, e foi, por longo tempo, o único conhecido. É o principal componente do tecido fibroso de peles e tendões e de tecidos calcificados como ossos e

dentina. Devido a sua maior ocorrência, e por razões técnicas e econômicas, o colagênio tipo I é o de maior interesse para usos industriais.

O colagênio é a proteína mais abundante nos mamíferos, constituindo uma quarta parte do peso total do animal. Está presente em todo tecido conectivo, sendo responsável pela força e estabilidade deste tecido. A incomparável estrutura fibrosa do colagênio, uma tríplice hélice que se associa em fibras, proporciona um suporte insolúvel que dá força e forma à pele, tendões, ossos, córneas e dentes (BROWN, 2009 e BAREIL *et al.* 2011).

O colagênio é conhecido por seu alto conteúdo de glicina (Gly), prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hpr). Embora cerca de 25% das repetições tripeptídicas sejam Gly-Pro-Y ou Gly-X-Hpr, a maior parte dos outros aminoácidos são encontrados nas posições X ou Y (BROWN, 2009).

A estrutura do colagênio é constituída por uma sequência repetitiva de três resíduos de aminoácidos por passo, conhecido como o triplete Gly-X-Y. Gly é a glicina e as posições X e Y são, preferencialmente, ocupadas por prolina e hidroxiprolina, respectivamente. A Glicina, o aminoácido mais simples, é o mais abundante no colagênio, de cada três resíduos de aminoácidos, um é glicina. Alanina, a próxima mais simples, aparece em um de cada nove resíduos. Os aminoácidos prolina e hidroxiprolina ocupam pelo menos dois em cada nove resíduos (MANCOPES *et al.*, 2008).

O colagênio tem elevado conteúdo de hidroxiprolina (8,32 mol hidroxiprolina/ 100 mol de aminoácidos), assim o conteúdo de colagênio da pele pode ser calculado a partir da análise quantitativa de hidroxiprolina (GUTTERRES, 2004).

Comumente isolado a partir de materiais provindos de animais, como gado, porcos ou aves domésticas, o colagênio vem sendo usado na indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos, devido a sua excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade (LIU *et al.*, 2012).

Para aplicação do colagênio em biomedicina ou em outras aplicações industriais, a proteína é isolada a partir da pele, tendão ou osso, e então modificada ou levada à forma de uma matriz estável não muito diferente à do couro. As características únicas da formação das fibras do colagênio, o torna um ingrediente útil para a manufatura de biomateriais. O objetivo dos estudos em cima da estrutura do colagênio é permitir a concepção de material para uso na

substituição de órgãos, suportes para o crescimento celular e outros biomateriais. O uso do colagênio mineralizado como base para a substituição de suporte para osso é uma área de pesquisa ativa na biomedicina. Misturas de colagênio e glicosaminoglicanos são largamente utilizadas para fabricar suportes que simulam a estrutura e a função biológica da matriz extracelular (BROWN, 2009).

O colagênio é amplamente utilizado em biomedicina, na cicatrização de feridas, implantes esponjosos, dispersões injetáveis. No entanto, uma desvantagem dos sistemas porosos feitos a partir do colagênio é falta de estabilidade mecânica (SCHLOEGL *et al.*, 2012).

Na indústria farmacêutica, o colagênio pode ser usado na produção de curativos, implantes vítreos e como veículos para administração de medicamentos. Em adição, o colagênio tem sido utilizado na produção de invólucros comestíveis para as indústrias de processamento de carnes (salsichas, salames) (SINGH *et al.*, 2011).

Proteínas interfibrilares

A rede de fibras do colagênio está incorporada em um líquido viscoso ou gel de carboidratos de grande peso molecular chamados mucopolissacarídeos. Este volumoso agregado de partículas preenche o espaço interfibrilar com material semelhante a um gel altamente viscoso, o qual se liga a um grande número de moléculas de água e age com uma barreira às partículas grandes. Agindo, também como agente lubrificante e um amortecedor mecânico. As peles contêm dois carboidratos principais contendo ácido hialurônico, uma proteína de glicosaminoglicano pura e livre com elevado peso molecular, e dermatan sulfato, um proteoglicano. Os proteoglicanos consistem em uma cadeia de proteína com longas cadeias laterais ligadas covalentemente aos glicosaminoglicanos (GAG's). Todo o tecido conjuntivo da esclera, tendões, ossos, córnea e pele contêm quantidades mensuráveis de proteoglicanos. A remoção de proteoglicanos da pele tem sido considerada um monitor do grau de abertura da pele. Por outro lado, os proteoglicanos são sensíveis à grande variedade de enzimas proteolíticas (HEIDEMANN, 1993).

Os glicosaminoglicanos são polieletrólitos típicos dos fluidos orgânicos celulares e extracelulares. Eles controlam a viscosidade destes fluidos, atuando como amortecedores nos

tecidos, participando no transporte de íons e na economia de água no organismo devido a sua característica higroscópica. As operações de lavagem e caleiro de peles são provavelmente controladas em função dos glicosaminoglicanos (BIENKIEWICZ, 1983).

2.3 Processamento de peles em couro

A transformação das peles em couros implicada a passagem das mesmas por uma série de processos e operações, realizadas em etapas. 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. As operações de depilação e caleiro, por ser o foco deste trabalho, serão abordadas com maior atenção.

Ribeira

A ribeira é a primeira fase do processamento. Consiste em operações em meio aquoso e operações mecânicas que visam limpar a pele e prepará-la para o curtimento. Nessa fase devem ser removidos todos os materiais não formadores do couro, como epiderme, hipoderme e material interfibrilar. As operações de ribeira são: pré-descarne, remolho, **depilação e caleiro**, descarne e divisão, desencalagem, purga e píquel.

Pré-descarne

Tem como objetivo uma prévia eliminação dos materiais aderidos ao carnal, como o tecido adiposo (gordura). É realizado em máquina descarnadeira. Conforme Dettmer (2012), Passos (2007) e Aquim (2004), algumas vantagens da realização do pré-descarne no início são a facilidade de manuseio, a penetração mais rápida e uniforme dos produtos químicos e a possibilidade de padronizar a ribeira, obtendo-se uma maior valorização dos subprodutos sebo e proteína da hipoderme.

Remolho

O remolho é um processo de limpeza e reidratação das peles. Seus objetivos principais são interromper a conservação, levando a pele verde ou salgada ao estado de pele fresca (hidratada), e promover a limpeza superficial da pele, além de extrair as proteínas globulares, retirar produtos químicos adicionados durante a conservação; extrair materiais (sangue,

sujeitas e esterco) e preparar as peles adequadamente para as operações e processos seguintes. Além de promover flexibilidade em todas as zonas da pele, e de dar um tato escorregadio no lado do carnal (PASSOS, 2007; DETTMER, 2012; AQUIM, 2009, FUCK, 2008).

O processo de remolho é realizado em molinetas de formato semicilíndrico (para peleteria) e em fulões. Esta é uma etapa de muita importância para o couro, pois um remolho mal feito ou insuficiente pode ocasionar danos às peles (GUTTERRES, 2010).

Depilação/caleiro

A etapa de depilação é o primeiro grande passo na manufatura de couros, influenciando de forma determinante na qualidade do couro produzido. Os objetivos desta etapa são: retirar o pelo ou lã (incluindo suas raízes e todo material queratinoso que preenche os folículos pilosos), remover a epiderme, intumescer e separar as fibras e fibrilas do colagênio, além de continuar o desengraxe que tem início no remolho (PASSOS, 2007; SOUZA, 2010; FUCK, 2008; DETTMER, 2012). Outros efeitos obtidos são o afrouxamento da trama de fibras do colagênio, a saponificação parcial das gorduras naturais e a abertura da pele e liberação dos grupos reativos para o curtimento (BASF, 2004).

A maneira como a depilação é realizada, a concentração e os tipos de produtos químicos utilizados e o tempo de duração da etapa de depilação, são determinantes para que os couros, após o curtimento, adquiram propriedades como resistência e suavidade (JOHN, 1998).

Para que ocorra a remoção do pelo e da epiderme, ou seja, o enfraquecimento ou até mesmo a destruição da queratina formadora do pelo e da epiderme, as pontes dissulfídicas e de hidrogênio que estabilizam a proteína queratina devem ser eliminadas. As pontes de hidrogênio, mais fracas que as dissulfídicas, podem ser destruídas por ação das bases de Lewis, substâncias doadoras de elétrons, como OH^- , H_2NR , HSR , etc. Já as pontes dissulfídicas necessitam, além da alcalinidade fornecida por grupos OH^- , também de compostos capazes de substituir o enxofre presente no aminoácido cistina, evitando assim a reestruturação das pontes (SOUSA, 2006).

O sistema mais usado e conhecido é o sistema de depilação por redução química, conhecido como cal-sulfeto. Segundo Aquim (2009), o sulfeto de sódio é empregado para

destruir os pelos e a epiderme e, para que haja inchamento, intumescimento da pele e desdobraimento das fibras, é empregado o óxido de cálcio (cal).

Os íons sulfeto, apesar de serem excelentes agentes depilantes, também requerem certo grau de alcalinidade para reagirem de maneira completa com a cistina. No caso do sulfeto de sódio, essa alcalinidade é parcialmente suprida pela dissociação alcalina desse sal em água, e a alcalinidade restante é promovida pelo hidróxido de cálcio. A destruição e a dissolução do pelo baseiam-se na quebra das ligações dissulfídicas. Na depilação sem destruição do pelo, há parcial ou total destruição dos tecidos que sustentam o pelo, ou seja, os componentes da epiderme circundante ao folículo e a raiz do pelo. A queratina destes tecidos contém poucas ligações dissulfídicas se comparada com as queratinas duras (SOUSA, 2006; GALARZA, *et al.*, 2009)

A Figura 2 apresenta imagens de pelos atacados quimicamente pelo sulfeto de sódio e pelos afrouxados por um sistema sem destruição destes. A imagem (a) mostra a decomposição (quebra) do pelo devida a ação do sulfeto de sódio e a imagem (b) mostra a ação de enzimas na base do folículo piloso, confirmando a hipótese de que o pelo é removido a partir da raiz (SOUZA e GUTTERRES, 2012).

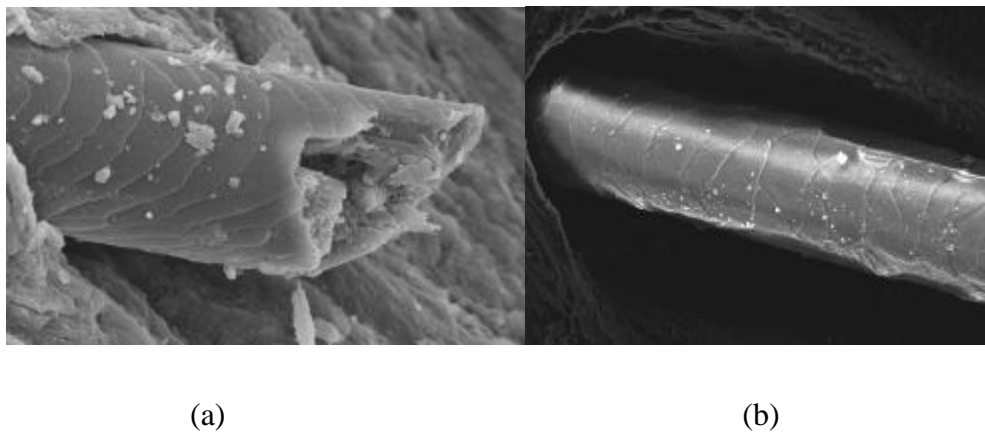


Figura 2. Imagens de pelos após depilação: (a) sulfeto de sódio, (b) processo co-enzimático.

Fonte: Souza e Gutterres (2012)

As ligações 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.

O processo de depilação normalmente é feito em meio aquoso, mas também pode ser desenvolvido com a aplicação de uma pasta. A depilação com pasta é empregada em peles de estrutura mais delicada, ou quando o pelo ou lã tem valor comercial. A depilação pode seguir duas rotas distintas: baseado no afrouxamento do pelo (com a preservação do mesmo) ou baseado na destruição das estruturas queratinosas. Os processos com afrouxamento do pelo 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” (macias), que se distribuem na epiderme e membrana basal dos folículos pilosos, desta forma os pelos são afrouxados e removidos (e sua estrutura é mantida preservada) (GUTTERRES, 2010; SOUZA, 2010).

O uso de óxido de cálcio no processo conhecido como caleiro tem como objetivos fornecer alcalinidade e favorecer o inchamento da pele para facilitar a remoção dos pelos remanescentes nos folículos pilosos, uma vez que, em água é convertido em álcali (SOUZA, 2010).

O principal problema relacionado ao processo de depilação com uso de cal e sulfeto de sódio está relacionado à toxicidade destes elementos. O dano ambiental causado pelo efluente que contém estes produtos químicos, é observado pela elevação do pH, demanda biológica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), além da geração de sulfetos, como o ácido sulfídrico, também chamado gás sulfídrico, que é um gás tóxico.

Com isso, tornou-se fundamental o estudo de tecnologias alternativas ao uso de cal e sulfeto de sódio da etapa de depilação. Dentre estas alternativas, encontram-se o uso de aminas, de enzimas e de produtos oxidantes.

O uso de aminas apresenta bons resultados, porém quando usadas sozinhas provocam inchamento liotrópico sem dar turbidez à pele. O problema da depilação com aminas é o custo elevado, portanto é utilizada apenas em casos especiais ou quando os sulfatos criam sérios problemas no tratamento de águas residuais de um curtume (AQUIM, 2004).

As aminas agem como tamponantes do sistema, reduzindo o efeito de inchamento e o seu emprego resulta em tripas mais abertas com flor mais fina e lisa. São normalmente empregadas em conjunto com o sulfeto de sódio e cal (GUTTERRES, 2010).

Com o uso de dimetilamina, nas maiorias das vezes, é necessária a adição de algum reagente alcalino. De acordo com a concentração e temperatura, pode-se ajustar o processo para uma depilação livre de sulfeto, com destruição ou conservação do pelo. Segundo Heidemann (1993), as aminas, especialmente, dimetilamina, foram usadas há muito tempo na indústria do couro americana. Foi assim por alguns anos, até que foram removidas do mercado devido à formação de nitrosaminas carcinogênicas na atmosfera dos curtumes.

Agentes oxidantes têm sido propostos para resolver problemas de toxicidade e de odores de sulfeto e compostos de enxofre. Produtos oxidantes oferecem uma alternativa ao uso de sulfeto de sódio através de um rápido processo de depilação. Segundo Heidemann (1993), as peles ficam mais limpas e uniformes em cor, e o couro fica mais macio devido ao ataque oxidativo a rede de fibras do colagênio.

Tanto o sulfeto de sódio quanto o peróxido de hidrogênio agem em condições alcalinas, porém o sulfeto de sódio age como um agente redutor, enquanto o peróxido de hidrogênio atua como um oxidante, decompondo-se e transformando-se em água, gerando assim efluentes menos poluentes e de fácil reutilização (MORERA *et al.*, 2006).

Os métodos enzimáticos de depilação podem ser considerados como um dos mais recentes e também um dos mais antigos já utilizados em curtumes. Antigamente 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 pelo. A remoção era efetivada mecanicamente (GUTTERRES, 2010). Atualmente, a depilação enzimática vem sendo estudada por diversos autores como alternativa ao uso do sistema cal-sulfeto.

Segundo Aquim (2009), a depilação enzimática apresenta custos mais elevados, mas apresenta vantagens como: aumento da área do couro, dando um melhor retorno financeiro, além de diminuir a quantidade necessária de água, bem como a contaminação do efluente, devido à minimização de produtos químicos adicionados.

Outras vantagens do uso de enzimas são: a ação simultânea de depilação e purga, as peles depiladas são limpas em ambos os lados, o pelos são recuperados intactos, podendo ser

utilizados em outros fins. Os efluentes são mais facilmente tratados, e há redução dos parâmetros de poluição, como DQO e DBO, e toxicidade. O uso da enzima na indústria do couro, também, permite a redução no tempo de processo, pode solucionar problemas na integridade da flor e problemas de flor solta no artigo final, além da igualização de couros de distintas raças e tamanhos, e a melhora na igualização de toque do artigo final (HERRMANN, 2006; WANG *et al.*, 2009; SEGANFREDO, 2012).

Muitos trabalhos têm sido realizados a fim de encontrar alternativas ao uso de cal e sulfeto de sódio nesta etapa do processamento de couros. Diversos autores estudaram a aplicação de enzimas, bem como o uso de peróxidos, na depilação de peles. Estes trabalhos serão apresentados posteriormente.

Descarne e Divisão

O descarne tem por objetivo eliminar materiais aderidos ao carnal (tecido adiposo e subcutâneo). É feito em máquina de descarnar (descarnadeira). Sua finalidade é facilitar a penetração dos produtos químicos aplicados em etapas posteriores (AQUIM, 2004 e 2009; DETTMER, 2012).

Na divisão a pele é submetida à divisão em duas camadas. A camada superficial é denominada de flor, que junto com a parte da camada reticular formam o couro. A camada inferior, denominada de crosta ou raspa, forma a camurça ou é utilizada para outro fim (fabricação de osso para cachorro ou gelatina) (AQUIM, 2004 e 2009; FUCK, 2008).

Desencalagem

A principal finalidade da desencalagem é a remoção da cal que foi incorporada à pele, tanto a fração que está quimicamente combinada, quanto a que não está ligada à estrutura. Reverte-se, também, o inchamento da pele desprovida do pelo e ajusta-se o pH para a purga. Para este fim, são utilizados produtos desencalantes, como sais amoniacais e sais ácidos. Uma desencalagem incompleta pode gerar couros com a flor tensionada, solta e quebradiça (AQUIM, 2004; PASSOS, 2007, FUCK, 2008; JOHN, 1998).

Purga

A purga age sobre as peles retirando materiais queratinosos degradados, desdobrando gorduras em ácidos graxos e glicerol e decompondo fibroblastos. Na purga, enzimas proteolíticas limpam a pele dos restos de epiderme, pelo e gordura, originando uma flor mais firme e sedosa. As purgas empregadas no curtume podem ser obtidas, geralmente, de pâncreas de animais, de cultura de fungos e de bactérias (AQUIM, 2004 e 2009; PASSOS, 2007; FUCK, 2008; DETTMER, 2012).

Sua finalidade é prosseguir com o afrouxamento e peptização da estrutura fibrosa da pele e eliminar o material interfibrilar e as rufas residuais. (BASF, 2004). Quanto mais suave e solto deve ser o couro, mais forte deverá ser a intensidade da purga (JOHN, 1998).

Píquel

O objetivo desta etapa é preparar as fibras do colagênio para uma fácil penetração do agente curtente. A operação de píquel é muito importante para a etapa seguinte, que é o curtimento, pois sua finalidade é acidificar a pele para que quando entrar em contato com o agente curtente este penetre e não haja somente um curtimento superficial (AQUIM, 2004 e 2009; PASSOS, 2007; DETTMER, 2012).

Curtimento

No curtimento a estrutura da pele é estabilizada, tornando-se imputrescível. Nesta etapa o agente curtente reage com a proteína da pele, conferindo características importantes ao couro, como aumento da temperatura de retração, estabilização frente à ação de microrganismos, e estabilização química e hidrotérmica da estrutura. Nesta etapa, ocorre o aumento da estabilidade de todo o sistema do colagênio e diminui a sua tendência ao inchamento. Devido à grande variedade de couros é fácil supor que são muitos os tipos possíveis de curtimento existentes, sendo o mais utilizado o curtimento ao cromo. As etapas que envolvem o processo de curtimento são duas, pela ordem: a difusão e a fixação do curtente (PASSOS, 2007; DETTMER, 2012).

Acabamento

Para finalizar o processo, o couro entra para a fase de acabamento. Os objetivos das etapas de acabamento são manter, ou melhorar, o aspecto do couro e atender as especificações do produto final, como cor, resistências físico-químicas e microbiológicas, maciez e toque ao artigo, entre outras. O acabamento pode ser dividido nas seguintes etapas: acabamento molhado, secagem e pré-acabamento e acabamento propriamente dito. O acabamento molhado, também chamado recurtimento, é a única das etapas realizadas após o curtimento que é feita em meio aquoso (AQUIM, 2004; FUCK, 2008).

2.4 Geração de resíduos em curtumes

Os efluentes e resíduos gerados pela indústria do couro possuem alta toxicidade, devido à elevada carga orgânica e à existência de produtos químicos em sua composição.

Com a geração de resíduos com altas concentrações de orgânicos, sais e metais pesados (compostos de cromo), na forma líquida ou sólida, o impacto ambiental da indústria do couro é, geralmente, significativo. O processamento de peles em geral emprega uma quantidade significativa de produtos químicos. Como usualmente os fluxos de efluentes de diversas correntes são misturados, a composição do efluente de curtume é muito complexa. O sulfeto de sódio, usado na etapa de depilação/caleiro, é um dos materiais mais perigosos usados no processamento de peles. Mediante acidificação, soluções contendo sulfetos liberarão gás sulfeto de hidrogênio na atmosfera (NAZER *et al.*, 2006).

Além da geração de resíduos de alta toxicidade, os curtumes são potenciais geradores de odores de natureza e origens variadas. Os compostos de amina provêm da degradação das proteínas do curtimento e do tingimento, os ácidos graxos estão ligados à biodegradação de matérias orgânicas, os compostos de enxofre (H_2S e os mercaptanos) provêm majoritariamente dos processos de depilação e caleiro, os compostos de carbonila e os aldeídos provêm essencialmente dos processos de acabamento (utilização de solventes do tipo que gera compostos orgânicos voláteis), o percloroetileno, nos raros casos de desengraxe com solventes organoclorados. O odor mais forte, mais marcante e específico nos curtumes está ligado à presença de H_2S (sulfeto de hidrogênio ou gás sulfídrico). Sulfeto e sulfidrato de sódio são utilizados na depilação, porém esta operação é realizada em meio alcalino. Em meio

ácido (misturada aos banhos de curtimento, por exemplo) a solução libera H_2S , com odor característico de ovo podre. Porém, com o aumento da concentração, a percepção do odor diminui e a toxicidade da substância se torna muito importante, podendo chegar a ser letal (TOULOUMET, 2011). O sulfeto de hidrogênio (H_2S), pode ser fatal em concentrações menores que 200 ppm (HANNA and ROTH, 1991. *apud* SIVASUBRAMANIAN *et al*, 2008a; WANG *et al.*, 2009).

De acordo com Galarza *et al.* (2009), o teor de matéria orgânica e a presença de sólidos suspensos no efluente líquido depende do processo de depilação usado; o processo convencional com degradação do pelo, com base no uso de cal e sulfeto de sódio, gera os maiores valores de poluição entre as etapas de ribeira. A cal e o sulfeto de sódio, apesar de sua natureza altamente poluente, são comumente utilizados devido à sua vantagem econômica. Segundo Galarza *et al.*, 2009, o desenvolvimento de tecnologias sem a destruição do pelo, em suas diferentes modalidades, está produzindo mudanças nas tecnologias tradicionais da indústria do curtimento mundial. Os argumentos que regem esta mudança tecnológica são: a redução da carga orgânica no efluente (expressa em termos da Demanda Química de Oxigênio, entre 40-60%), da concentração de sulfetos (em torno de 50%), e de sólidos suspensos e sedimentáveis (em torno de 75%). Em um processo com recuperação do pelo é possível recuperar o pelo ao nível em torno de 10% do peso da pele bovina salgada (considerando umidade de 70-75%).

Assim, a aplicação de tecnologias alternativas ao uso de cal e sulfeto de sódio na depilação de peles vem sendo investigada por muitos autores. Um exemplo é a aplicação da biotecnologia, através do uso de enzimas como agente depilante. Outra alternativa que vem sendo estudada é o uso de agentes oxidantes, que além de oferecerem um processo de depilação mais rápido, contribuem para a diminuição da toxicidade dos banhos residuais.

O uso de enzimas e de produtos oxidantes nesta etapa do processamento de peles como substitutos ao sulfeto de sódio e cal representa uma alternativa para a redução do impacto ambiental gerado por essa atividade.

2.5 Enzimas

As aplicações de enzimas estão obviamente vinculadas ao mercado mundial e podem ser divididas em aplicações industriais, enzimas para uso médico e enzimas para uso analítico e científico. As principais aplicações, principalmente industriais, estão dentro do que se convencionou chamar de biotecnologia. A biotecnologia certamente envolve microbiologia, bioquímica, genética e engenharia química e bioquímica no processamento de materiais por agentes biológicos. Dentre esses agentes, as enzimas são frequentemente utilizadas para melhoria de processos e possibilitar o uso de novas matérias-primas, melhorando suas características físico-químicas e também as de vários produtos. Os principais consumidores industriais de enzimas são as indústrias de detergentes, de processamento de amido e laticínios, enquanto as cervejarias, as indústrias de sucos de fruta e vinho, panificação, têxtil e papel, e couro apresentam um menor consumo. No processamento de couros as proteases encontram uma ampla aplicação durante as várias fases. Na fase inicial de limpeza é necessário haver uma reidratação, passando pela remoção dos pelos, onde é utilizada uma protease alcalina, porque o pH básico ajuda na exposição dos folículos pilosos, facilitando sua remoção. Nas fases finais, onde é necessária uma degradação parcial da queratina e elastina presentes, existindo também a ação devido à quebra do colágeno. As proteases mais utilizadas são as de origem animal, fúngica e bacteriana (NETO, 2001).

De acordo com Gutterres (2006), as enzimas aplicadas ao couro são de três tipos:

- Proteases: oferecem um alto nível de seletividade na remoção de proteínas indesejáveis, epiderme e pelo, enquanto mantêm as fibras de colagênio intactas;
- Lipases: agem nas gorduras e lipídeos da carne e nas graxas e óleos produzidos nas glândulas;
- Elastases: agem na elastina, uma proteína de tecidos elásticos, como a pele e membranas internas.

As proteases hidrolisam uma fração de dermatan sulfato (um glicosaminoglicano) da proteína, tornando o colagênio mais acessível à água, e agem na remoção de proteínas globulares. As lipases hidrolisam as gorduras, óleos e graxas, presentes na hipoderme. E as queratinases hidrolisam a queratina do pelo e da epiderme, quebrando as pontes dissulfeto desta molécula (SOUZA e GUTTERRES, 2012).

Na manufatura de couros, as enzimas encontram utilização nas etapas de remolho, depilação e caleiro, purga, desengraxe, no tratamento de resíduos e na expansão de área (GUTTERRES, 2006).

O uso de enzimas no remolho auxilia na degradação e na solubilização de proteínas globulares, mucopolissacarídeos e proteoglicanos (para peles frescas), no enfraquecimento da queratina e na mais rápida distribuição de água entre as fibras (para peles salgadas e secas). A ação das enzimas na etapa de depilação promove uma limpeza mais profunda, com uma melhor abertura das peles, e proporciona um menor inchamento. Já na etapa de purga, as enzimas completam a limpeza de raízes de pelos e restos de pele, e atacam ligeiramente a elastina, melhorando a maciez do couro obtido (SANTELLI, 2006).

De acordo com Wang *et al.* (2009), enzimas utilizadas como agentes depilantes na manufatura do couro são de grande interesse, pois de uma maneira suave, mas rápida, são capazes de eliminar um problema de disposição de resíduos, já que uma das vantagens da depilação enzimática é a recuperação de pelos intactos ao final do processo.

No processamento de couros, as proteases são usadas na hidrólise seletiva de componentes não colagênicos das peles e couros. O couro tratado com protease apresenta melhor eficiência de limpeza e depilação. As enzimas proporcionam melhor desempenho em processos industriais, garantem a produção de couro de melhor qualidade, além do fato de que as enzimas líquidas são mais fáceis de usar, não produzem pó e contribuem para a saúde e segurança do trabalhador (SEGANFREDO, 2012).

Segundo Gutterres (2006), na etapa de remolho o uso de enzimas (proteases e lipases) oferece uma reidratação mais eficiente, melhor abertura de fibra e penetração de reagentes, degradação e dispersão de gorduras, remoção de carboidratos e proteínas da pele, além de promover a preservação da integridade do colágeno. Na depilação e caleiro, as enzimas dão aumento de área ao couro, melhor retorno financeiro e menores contaminações nos efluentes. Já na etapa de purga, o uso de enzimas promove a remoção de proteínas não estruturais, auxilia na remoção de carboidratos e permite a remoção de pelos e epiderme degradados. A utilização de enzimas no desengraxe, por sua vez, visa à substituição ao uso de solventes orgânicos e surfactantes. No tratamento de resíduos, as enzimas proteolíticas, neutras e alcalinas, são usadas em restos de gordura e músculo gerando hidrolisados ricos em gordura e proteínas. A hidrólise enzimática de aparas e farelo de couro produz colágeno hidrolisado.

Além disso, o uso de elastase (enzima que degrada a elastina) no couro *wet-blue*, promove um aumento de área e de maciez sem prejudicar a resistência.

2.6 Produtos oxidantes e peróxido de hidrogênio

Segundo a CETESB (2012), um produto oxidante libera oxigênio rapidamente para sustentar a combustão dos materiais orgânicos. Outra definição semelhante afirma que o oxidante é um material que gera oxigênio à temperatura ambiente, ou quando levemente aquecido. Assim, pode-se verificar que ambas as definições afirmam que o oxigênio é sempre liberado por um agente oxidante. Devido à facilidade de liberação do oxigênio, estas substâncias são relativamente instáveis e reagem quimicamente com uma grande variedade de produtos. Outro aspecto a considerar é a grande reatividade dos oxidantes com compostos orgânicos.

Os peróxidos orgânicos são agentes de alto poder oxidante. Os peróxidos apresentam a estrutura - O – O- e podem ser considerados derivados do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), onde um ou ambos os átomos de hidrogênio foram substituídos por radicais orgânicos.

De acordo com Mattos *et al.* (2003), o peróxido de hidrogênio é um dos oxidantes mais versáteis que existe, superior ao cloro, dióxido de cloro e permanganato de potássio. Através de catálise, o peróxido pode ser convertido em radical hidroxila com reatividade inferior apenas ao flúor. Apesar do poder de reação, o peróxido de hidrogênio é um metabólito natural em muitos organismos, o qual, quando decomposto, resulta em oxigênio molecular e água.

O peróxido de hidrogênio é usado como agente esterilizante na indústria de alimentos para filtros e tubulações há muito tempo e, em razão da sua eficácia, passou a ser usado em outras áreas, inclusive na prática hospitalar para antissepsia de ferimentos. É usado como desinfetante líquido e antisséptico. Possui baixa toxicidade, não é inativado por matéria orgânica. Incompatível com borracha, tecidos e metais (alumínio, ferro, chumbo, titânio, níquel, cromo, prata, zinco e manganês) (VERMELHO *et al.*, 2006).

Na manufatura do couro, mais precisamente na etapa de depilação, o peróxido de hidrogênio vem sendo objeto de estudo por muitos autores, como Marsal *et al.* (1999),

Marmer *et al.* (2003), Marsal *et al.* (2002), Bronco *et al.* (2005), e Shi *et al.* (2003), como alternativa ao uso de cal e sulfeto de sódio.

Tanto o sulfeto de sódio quanto o peróxido de hidrogênio atuam em condições alcalinas. Porém, o sulfeto de sódio age como um agente redutor, enquanto o peróxido de hidrogênio atua como um agente oxidante, decompondo-se e transformando-se em água. Os efluentes assim gerados são menos poluentes e mais facilmente reutilizáveis (MORERA *et al.*, 2006).

Os estudos feitos com o uso de peróxido de hidrogênio têm demonstrado que é possível evitar o uso do sulfeto de sódio. Para avaliar a qualidade do couro final, várias atividades experimentais têm sido realizadas, tanto em escala de laboratório ou industrial. Os resultados mostram que a qualidade do couro obtido é comparável à do couro obtido pelo processo convencional (sulfeto de sódio), em termos de propriedades técnicas e físico-mecânicas. Em adição, o processo oxidativo tem demonstrado ser econômico e prático de ser implementado, pois é compatível com os equipamentos já instalados na planta (CASTIELLO *et al.*, 2008).

2.7 Aplicação de enzimas e produtos químicos oxidantes na indústria do couro (Depilação)

Até o momento, os métodos biológicos estão sendo utilizados, com relativo sucesso, no remolho (limpeza e reidratação), depilação, purga (remoção de proteínas não desejadas), e em parte, no desengraxe (THANIKAIVELAN *et al.*, 2004).

Sivasubramanian *et al.* (2008a) realizaram três experimentos de depilação. Na depilação com enzimas houve remoção completa da epiderme, estruturas glandulares, pelos e folículos após o tratamento. No processo convencional com uso de cal e sulfeto de sódio houve remoção incompleta destas camadas, e no processo misto usando enzimas comerciais e menores quantidades de cal e sulfeto de sódio, a remoção destas foi moderada. No processo enzimático somente houve maior abertura das fibras do colagênio, não sendo observado danos a estas fibras. Na depilação com enzimas os pelos intactos foram recuperados, já na depilação convencional os pelos foram dissolvidos. Verificou-se a diminuição da carga poluidora e da

toxicidade do efluente gerado pela depilação enzimática. Os couros obtidos pelo tratamento enzimático apresentaram maior resistência à tração e maior tensão de ruptura.

Aquim *et al.* (2008) e Aquim (2009) realizaram uma avaliação comparativa entre o remolho e depilação/caleiro convencionais e com o uso de enzimas comerciais. A avaliação do processo foi feita em função da qualidade da pele obtida, realizada por MEV (microscopia eletrônica de varredura), a fim de se avaliar a rede de fibras. A pele também foi submetida a testes físicos. A abertura das fibras é importante para que os insumos sejam mais bem absorvidos nas etapas de curtimento e recurtimento. Pela análise de MEV observaram-se resultados semelhantes para os processos. Os testes físicos de tração não apresentaram diferenças significativas entre as amostras dos processos convencionais e enzimáticos. Com relação às tensões de ruptura, os resultados mostraram que não houve perdas significativas de resistência mecânica do material do processo enzimático.

Crispim e Mota (2003), a fim de avaliar a potencial aplicação de enzimas na depilação sem destruição dos pelos, utilizaram dois preparados com proteases alcalinas com quantidades reduzidas de sulfeto de sódio. Em comparação ao método clássico de depilação com sulfeto, houve uma redução de 50% de sulfetos no efluente, e uma redução de 40% de sólidos suspensos.

Valeika *et al.* (2009), desenvolveram um novo método de depilação com recuperação do pelo, utilizando diferentes preparados enzimáticos (proteases alcalinas). Foram realizados experimentos com o uso de enzimas e quantidades reduzidas de sulfeto de sódio. A atividade proteolítica das enzimas foi determinada usando caseína como substrato. A quantidade de cistina nas soluções foi determinada por um método colorimétrico. Os resíduos gerados mostraram-se menos poluentes, por não conter compostos insolúveis de cálcio, grandes quantidades de sulfetos e proteínas solúveis. Em geral, o resíduo deve conter 20 vezes menos sulfetos do que o processo convencional. As melhores condições da depilação sulfeto-enzimática foram no tempo de 5,2 – 7,0 horas, na faixa de pH entre 12,5 e 10,8, e com concentração de enzima entre 0,6 e 0,7%, em relação à massa de pele utilizada. Segundo o autor, este método permite a produção de couros com qualidade semelhante aos couros produzidos no modo tradicional, porém este método é, ainda, aproximadamente 10-15% mais caro que o método convencional.

Souza e Gutterres (2012) avaliaram o desempenho de cinco enzimas comerciais nas etapas de remolho e depilação/caleiro através da comparação entre os processos químicos e coenzimáticos em peles zebuínas. Nos processos químicos, realizados para fins comparativos, o remolho foi realizado com carbonato de sódio, e a depilação/caleiro, com sulfeto de sódio e hidróxido de cálcio. Os processos coenzimáticos foram realizados com enzimas e baixas concentrações de surfactante. Observou-se uma relação entre o tempo de processo e a remoção de proteína solúvel nos testes de remolho. Nos ensaios de depilação/caleiro, os resultados obtidos pelos testes de carbono orgânico total e proteína solúvel foram similares, porém os processos coenzimáticos mostraram-se mais eficientes que os processos químicos. As enzimas apresentaram afinidade a todos os substratos (queratina, colágeno e lipídeos).

Dettmer *et al.* (2011) estudaram cinco proteases comerciais usadas em curtumes, denominadas A, B, C (recomendadas para remolho e caleiro), D e E (enzimas de purga). Foi avaliada sua ação sobre o colagênio e sobre a queratina, e também sua capacidade de depilação. Todas as enzimas foram classificadas como colagenolíticas. As enzimas apresentaram maior atividade sobre o colagênio do que sobre a queratina. Após a caracterização, as enzimas foram testadas na depilação de peles bovinas. Pedacos de peles foram imersos na solução enzimática (5 mg de enzima mL⁻¹ de água destilada, pH 8,0) e incubadas por 18 h à temperatura ambiente. Em torno de 2 mL de solução enzimática/g de pele foram usados nos experimentos. O tratamento enzimático apresentou diferenças significativas, quando comparado ao processo convencional (cal e sulfeto de sódio). As peles tratadas com as enzimas A, B, C e E apresentaram grandes áreas depiladas, porém apresentaram coloração escura, causada pela incompleta remoção da epiderme e de pigmentos. A enzima D, por sua vez, apresentou fraca atividade sobre a epiderme.

Dettmer *et al.* (2012a e 2012b) isolaram novas linhagens de *Bacillus subtilis* produtoras de proteases, selecionadas do lodo aeróbico de um curtume, para ser aplicada na produção de couros. De todas as colônias cultivadas em placas, apenas 10 formaram halo translúcido, indicando a atividade proteolítica. Estas foram avaliadas através de suas atividades sobre os substratos *azocoll*, *keratin azure* e *azocaseína*. Destas, duas foram selecionadas para estudos, uma denominada BLBc 17, foi selecionada por apresentar maior atividade sobre *keratin azure*, o que indica maior efeito sobre a queratina, e uma denominada BLBc 11 por apresentar a menor atividade sobre o *azocoll*, o que indica um

menor efeito sobre o colagênio, a principal proteína da pele que deve ser preservada. Os extratos enzimáticos obtido através do cultivo da BLBc 17 e da BLBc 11 foram utilizados na depilação de peles bovinas. As peles depiladas com o extrato enzimático obtido pelo cultivo da BLBc 17 apresentaram poucos pelos remanescentes, já as peles depiladas com o extrato enzimático obtido pelo cultivo da BLBc 11 apresentaram grandes áreas sem pelo e pele ficou com aparência mais limpa, pois houve remoção da epiderme e de pigmentos. Houve grande remoção de proteínas interfibrilares (glicosaminoglicanos e proteoglicanos) nos processos enzimáticos, o que é muito importante, já que este efeito é o objetivo dos estágios iniciais do processamento do couro. No processo convencional, realizado para fins comparativos, não foi detectada liberação de hidroxiprolina, sugerindo que neste processo não há ataque ao colagênio. Contudo, o teor de hidroxiprolina liberado nos banhos dos processos enzimáticos foi pequeno e provavelmente causado pela atividade da enzima sobre o colagênio. Assim, verifica-se que os extratos enzimáticos podem ser utilizados como alternativa ao processo químico convencional na produção de couros.

Dettmer *et al.* (2012c) desenvolveram um método de depilação, utilizando somente o extrato enzimático produzido por uma nova linhagem de *Bacillus subtilis*, denominada BLBc11. A determinação do tempo ideal de processo foi baseada em análises de remoção de proteínas interfibrilares (proteoglicanos e glicosaminoglicanos), liberação de hidroxiprolina na solução, e na avaliação da superfície da pele através de imagens obtidas por microscopia ótica. Os resultados mostraram que após um período de 6 horas é possível obter peles suficientemente depiladas, sem danos e com remoção satisfatória de proteínas interfibrilares. O processo enzimático contribuiu para redução dos níveis de DQO e DBO nos efluentes gerados, juntamente com os níveis de nitrogênio e sulfetos. Não se verificou diferença na qualidade final do couro na comparação entre o processo enzimático e o convencional. Também foi observado que a depilação enzimática não causa perdas de resistência nas peles.

Morera *et al.* (2008) estudaram um método alternativo de depilação com recuperação dos pelos baseado na substituição do sulfeto de sódio por peróxido de hidrogênio como agente depilante e com recirculação de parte dos banhos. Comparado ao processo convencional, houve uma redução de, aproximadamente, 70% no consumo de água, de 35% na DQO, de 98% na toxicidade e de 50% de nitrogênio total. Os couros obtidos apresentaram propriedades químicas, físicas e organolépticas semelhantes.

Marsal *et al.* (1999) estudaram a depilação com o uso de peróxido de hidrogênio e aminas. Observou-se que a adição do produto a base de amina permitiu a redução da oferta de peróxido de hidrogênio (6%), quando comparada às peles depiladas apenas com o peróxido de hidrogênio (8%). Observou-se, também, que quando a oferta de peróxido de hidrogênio aumenta, o teor de Cr_2O_3 no couro, bem como a tensão de ruptura aumentam, enquanto a resistência à tração e a resistência ao rasgamento diminuem. Foi observada, também uma melhor mecanização da operação de divisão das peles depiladas. Marsal *et al.* (2002) observaram que a imunização prévia com hidróxido de cálcio permitiu que o pelo fosse recuperado, e que uma oferta de 1% de hidróxido de cálcio era suficiente. Uma concentração mínima de 4% de hidróxido de sódio é necessária para alcançar a depilação completa, e para esta quantidade de hidróxido de sódio, uma oferta de 2% de peróxido de hidrogênio foi suficiente para a depilação com recuperação dos pelos, sendo que um aumento na concentração de peróxido resultou na destruição dos pelos. Com relação à adição de enzimas, observou-se uma redução no tempo do processo e a obtenção de peles mais limpas.

Marmer *et al.* (2003) desenvolveram um processo rápido de depilação com o uso de peróxido de hidrogênio em meio alcalino. O uso de KOCN foi proposto a fim de reduzir a concentração de NaOH, já que altas concentrações desta base podem danificar a pele. O uso de peróxido de hidrogênio em meio alcalino produziu bons couros, mas alterando o meio com a adição de cal ou KOCN obtiveram-se melhores resultados. Marmer e Dudley (2005) utilizaram uma solução de depilação contendo 20% NaOH, 2,4% KOCN e 1% de H_2O_2 . Após 5 minutos os pelos residuais foram removidos com uma espátula. A solução foi coletada e usada para depilar um segundo pedaço de pele. Este processo foi repetido para um total de 10 pedaços de pele. Baseado nestes resultados, determinou-se que nas condições do experimento, a mistura de depilação poderia ser reutilizada 6 ou 7 vezes. Quanto ao banho residual, o material insolúvel, principalmente pelos, pode ser filtrado, e a proteína solubilizada pode ser removida por precipitação ácida.

Marmer e Dudley (2008) estudaram a depilação oxidativa com percarbonato de sódio, em substituição ao sulfeto de sódio. Os testes foram feitos com 5% de percarbonato e 7% de NaOH. Com exceção de alguns pelos curtos, o pelo foi removido em 4 horas em um processo de queima do pelo. Não se observou danos à flor. A pele depilada por oxidação não absorveu tanto corante quanto a depilada com sulfeto, resultando em tonalidades mais claras. As

propriedades do couro semiacabado apresentaram propriedades semelhantes ao semiacabado obtido a partir da depilação com sulfeto.

Bronco *et al.* (2005) desenvolveram um método de depilação, com uso de peróxido de hidrogênio, para a produção de couros bovinos de qualidade superior. Os autores observaram que ao longo do processo, o peróxido de hidrogênio gradualmente ataca as queratinas *soft* da raiz do pelo, deixando intactas as queratinas *hard* da haste. O sulfeto parece exercer um ataque mais energético e rápido, também nas queratinas da haste do pelo. Como resultado deste mecanismo, foi observada a presença de resíduos de pelos nos folículos na depilação com sulfeto, enquanto que na depilação oxidativa houve remoção completa dos pelos. Com relação às propriedades do couro final (curtido ao cromo), os couros obtidos pelo método de depilação tradicional e pelo método oxidativo apresentaram propriedades praticamente semelhantes. A ausência de cromo VI avaliada no couro obtido pelo processo oxidativo indica que o uso de peróxido de hidrogênio como agente oxidante não causa a oxidação do cromo III usado no curtimento.

Gehring *et al.* (2003) estudaram o uso de peróxido de cálcio como agente de depilação. Os testes foram realizados em laboratório em escala piloto. Em escala piloto, após 4 minutos de reação, aproximadamente 50 -75% dos pelos foram removidos. Não se observaram diferenças significativas nas propriedades físicas investigadas entre os couros obtidos pela depilação oxidativa e a depilação com sulfeto de sódio. Shi *et al.* (2003) realizaram testes de depilação com o uso de peróxido de hidrogênio em meio alcalino (hidróxido de sódio) em peles de cabra e gado. Comparado ao sulfeto de sódio, o peróxido de hidrogênio mostrou função de proteção ao colagênio da pele no processo de depilação. Esta função foi principalmente notável quando a oferta de H_2O_2 foi 5,5 – 9,5%. Com relação à eliminação de proteínas não colagênicas ao máximo possível, a ótima oferta de H_2O_2 foi entre 7,5 e 9,5%. O ponto isoelétrico das peles depiladas com H_2O_2 foi menor do que nas peles depiladas com Na_2S . O couro depilado com H_2O_2 apresentou maior teor de Cr_2O_3 após o curtimento. Gehring *et al.* (2006) apresentaram um método de depilação oxidativa usando peróxido de magnésio e peroximonosulfato de potássio. Observou-se a remoção de 80% dos pelos maiores, nos pedaços de pele bovina expostos a uma concentração de 5% de peróxido de magnésio, 15% de NaOH e 200% de água, à 45°C, por um tempo de 8 minutos. E nas peles expostas à 5% de peroximonosulfato de potássio, 15% de NaOH e 200% de água, à 45°C, durante 7 minutos, não houve danos à flor, e apenas alguns pelos curtos permaneciam na pele.

Sundar *et al.* (2006) estudaram um método de depilação com o uso de ozônio. Peles de cabra foram depiladas com 10% de cal em 100% de água inicialmente por 15 minutos, antes do início do fornecimento de ozônio. Ozônio na concentração de 2,25 mg L⁻¹ foi purgado no fulão a cada 30 minutos, até um tempo total de 120 minutos. O processo garante a soltura completa do pelo dentro de um período de 60 minutos, no caso de peles de cabra. Anders *et al.* (2004), desenvolveram dois processos oxidativos para melhorar a manufatura de couros. Os autores aplicaram peróxido de hidrogênio e diferentes enzimas na etapa de depilação, verificando que estas técnicas se adequam aos equipamentos do curtume. O couro wet-blue produzido pelo processo oxidativo gerou couros com a mesma distribuição de cromo ao longo da seção transversal e superfície. A camada flor apresentou excelentes propriedades de tingimento.

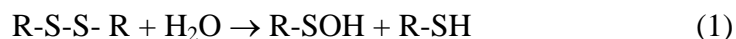
Percebe-se, portanto, que tanto a depilação enzimática, quanto a depilação oxidativa podem ser consideradas alternativas ao método convencional de depilação (cal e sulfeto de sódio). O uso dessas novas tecnologias permitem a geração de efluentes menos poluentes, e a produção de couros com qualidade semelhantes aos produzidos pela depilação química comumente utilizada.

Os processos com recuperação do pelo permitem a utilização destes. Os pelos recuperados podem ser utilizados na produção de feltros, fertilizantes orgânicos e na produção de ração para aves. Estes pelos, quando submetidos à hidrólise térmica, química ou biológica, podem ser aplicados na geração de biogás, na regeneração de queratinas, na produção de cosméticos, produtos farmacêuticos (SIVASUBRAMANIAN *et al.*, 2008a),

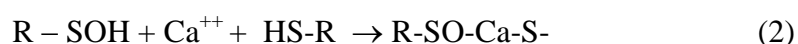
2.8 Depilação oxidativa com peróxido de hidrogênio (mecanismo) e imunização dos pelos

De acordo com Bronco *et al.* (2005), no processo tradicional de depilação com destruição dos pelos, a quebra das ligações de enxofre (-S-S-), que caracteriza a estrutura da queratina do pelo, é obtida com o uso de agentes redutores (sulfeto ou sulfidrato de sódio), acompanhado pelo uso de um álcali para hidrolisar os grupos -SH (tiol) das proteínas reduzidas e promover sua subsequente solubilização. Tradicionalmente, a hidrólise alcalina é realizada com o uso da cal. A remoção do pelo pela combinação de sulfetos e cal pode ser

grandemente prejudicada pela aplicação excessiva de cal antes da aplicação do sulfeto, o que causa o fenômeno chamado de imunização do pelo. Em solução alcalina, as ligações –S-S- da queratina podem ser quebradas de acordo com a equação:



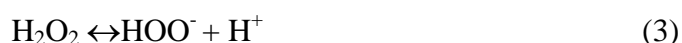
Entre as várias hipóteses, a formação de ligações transversais entre o íon bivalente Ca^{++} e os produtos da dissociação das ligações –S-S-, parece corresponder aos resultados de um teste comparativo conduzido com o uso de Na_2S como agente depilante. A imunização ocorre quando as peles são previamente tratadas com hidróxido de cálcio por um tempo prolongado. A imunização parece ser promovida preferencialmente pela presença de íons bivalentes que ligam os produtos de dissociação das ligações -S-S-, como representado pela equação:



O fenômeno da imunização é evitado pela adição simultânea de cal e sulfetos, e aproveitando a ação de cooperação do $-\text{OH}^+$ e SH^- que evitam que ocorra a imunização (BRONCO *et al.*, 2005).

Segundo Galarza *et al.* (2009), um tratamento alcalino anterior aos efeitos do sulfeto de sódio com solução de hidróxido de sódio ou hidróxido de cálcio em valores de pHs entre 11,5 e 12,5, conduz a um aumento significativo da resistência à degradação do pelo, mantendo assim uma considerável resistência à ruptura. Isto indica que novos e mais estáveis *crosslinks* substituíram as ligações dissulfeto.

De acordo com Bronco *et al.* (2005), quando se usa H_2O_2 para depilação, o ataque químico das ligações –S-S- ocorre através de um mecanismo diferente. O ataque oxidativo às ligações –S-S- é devido à formação do ânion peroxi a partir do H_2O_2 , que ocorre em meio altamente alcalino.



A função oxidativa do peróxido quebra as pontes de enxofre da cistina, o que é acelerado em meio alcalino. Uma vez que o ataque do H_2O_2 ao pelo acontece primeiro na raiz,

uma forte ação mecânica é necessária para remover o pelo e acelerar o processo. O ponto principal do processo com H_2O_2 é fazer o peróxido penetrar na raiz do pelo eficientemente (Shi *et al.*, 2003).

O H_2O_2 é efetivo na quebra somente da queratina macia (soft) presente na raiz do pelo, enquanto deixa intacta a queratina dura (hard) da haste. Por esta razão, o uso de cal como agente alcalino não é possível, porque o processo de imunização poderia evitar a quebra desejável das ligações –S-S- das proteínas da raiz do pelo (BRONCO *et al.*, 2005).

Segundo Shi *et al.* (2003), a imunização com hidróxido cálcio pode garantir a recuperação dos pelos, mas deve-se dar uma atenção particular à raiz do pelo, que pode ser protegida pela imunização. Assim sendo, a oferta de hidróxido de cálcio e o tempo de imunização devem ser bem controlados.

2.9 Depilação enzimática (mecanismo)

A chamada queratina *soft*, presente na camada de Malpighi, e na bainha do folículo do pelo e no bulbo, é mais facilmente atacada por substâncias depilantes do que a queratina *hard*, presente na haste do pelo. Estudos tem demonstrado que as enzimas proteolíticas no processo de depilação digerem as células da camada de Malpighi e as células basais do bulbo do pelo, e também afetam a medula, embora não o córtex. As pontes dissulfeto uma vez rompidas permitem a rápida digestão da queratina por enzimas proteolíticas (GALARZA *et al.*, 2009).

As proteases não podem atacar diretamente os componentes de epiderme e dos pelos, em vez disso, elas podem promover a depilação pela degradação destes componentes da membrana basal na junção derme-epiderme. O rompimento desta região levaria o descolamento simultâneo da membrana basal e epiderme da camada dérmica. Para conseguir maior difusão das enzimas para obter acesso às proteínas dos bulbos capilares e folículos, as substâncias de cementação devem ser removidas da derme (SIVASUBRAMANIAN *et al.*, 2008b).

Na depilação enzimática a raiz do pelo é atacada por uma seletiva ação proteolítica. O mecanismo da depilação enzimática é baseado na capacidade de quebra das ligações

peptídicas que envolvem a membrana basal do bulbo do pelo, que é constituída principalmente por proteoglicanos, tais como glicosaminoglicanos e dermatan sulfato, removendo assim os pelos de forma segura (SENTHILVELAN *et al.*, 2012).

Proteoglicanos são removidos tanto na depilação enzimática quanto na depilação com cal e sulfeto de sódio. Mas a taxa de remoção é relativamente maior na depilação com uso de enzimas. A fim de alcançar o conteúdo interfibrilar, a enzima tem que penetrar através da camada de carne. Uma vez que a enzima estiver em contato com a estrutura de fibras, os proteoglicanos são progressivamente removidos. A remoção progressiva de glicosaminoglicanos indica a eliminação de substâncias interfibrilares (SIVASUBRAMANIAN *et al.*, 2008b).

Algumas das vantagens da depilação com enzimas são: ação simultânea de depilação e purga, as peles são limpas em ambos os lados, o pelo não é destruído e há uma significativa redução dos parâmetros de poluição. Os pelos recuperados podem ser utilizados na produção de feltros e de fertilizantes orgânicos, por exemplo. Porém, a depilação enzimática não pode ser considerada uma simples substituição à depilação com cal e sulfeto de sódio. Enzimas são proteínas, portanto muitos fatores regulam suas funções e estabilidade. Sendo assim, os métodos enzimáticos requerem condições controladas de pH e temperatura para sua aplicação (WANG *et al.*, 2009).

2.10 Avaliação da ação enzimática e oxidativa na depilação de peles

Além do conhecimento dos mecanismos de ação das enzimas e do peróxido de hidrogênio durante a depilação das peles, é importante saber como avaliar a ação destes produtos de forma quantitativa ao final do processo.

A literatura descreve a avaliação do efeito de depilação pela determinação de proteínas, proteínas interfibrilares (glicosaminoglicanos e proteoglicanos), e pela determinação de hidroxiprolina. Quanto à pele, sua superfície é avaliada por microscopia óptica e/ou eletrônica. Além dessa análise, o efeito das enzimas e do peróxido pode ser avaliado com base na resistência mecânica do couro obtido. Além das análises de proteínas interfibrilares (glicosaminoglicanos e proteoglicanos) e de hidroxiprolina, os banhos residuais

geralmente são avaliados, também, pela determinação da quantidade de nitrogênio total, sólidos dissolvidos totais, fixos e voláteis, sulfetos, cloretos, sulfatos, sólidos suspensos, além de medidas de DQO e DBO, com a finalidade de verificar a toxicidade do efluente (SUNDAR *et al.*, 2006; BRONCO *et al.*, 2005; MORERA *et al.*, 2008; DETTMER *et al.*, 2012c; VALEIKA *et al.*, 2009; CRISPIM e MOTA, 2003; SIVASUBRAMANIAN *et al.*, 2008).

Decorina é um proteoglicano menor da pele (parte proteína e parte carboidrato) e é um dos componentes chaves que se submete a mudanças e remoção durante a transformação de peles em couro. A maior porção de decorina é removida durante a depilação das peles (RAMOS e LIU, 2010).

Conforme Ramos e Liu (2010) a remoção eficiente dos proteoglicanos da pele, durante seu processamento, é aceitável e benéfica, especialmente para garantir flexibilidade e suavidade ao couro final.

A remoção dos materiais interfibrilares, como proteínas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos, são partes fundamentais dos processos de purga e caleiro. Na etapa de purga, a remoção dos materiais interfibrilares é facilitada pelo uso de enzimas proteolíticas. A remoção de proteínas interfibrilares durante o caleiro e a purga é um fato bem estabelecido, porém a quantificação destes materiais ainda não é bem conhecida (MADHAN *et al.*, 2010).

Madhan *et al.* (2010), estimaram a quantidade de proteoglicanos e glicosaminoglicanos nos banhos residuais de caleiro e purga, realizados na maneira convencional. A determinação desse material interfibrilar foi realizada através de curvas padrão. Para a análise de proteoglicanos, a curva padrão foi feita utilizando mucina como o reagente padrão. Para a curva de glicosaminoglicanos, o padrão utilizado foi o sulfato de condroitina.

Dettmer (2012), e Dettmer *et al.* (2012a, 2012b, 2012c) utilizaram o recurso da construção de curvas padrão para estimar as quantidades de proteoglicanos e glicosaminoglicanos nos banhos residuais.

A hidroxiprolina, sendo um aminoácido característico do colagênio, é tradicionalmente usada para quantificar esta proteína (HOFMAN *et al.*, 2011). Hofman *et al.* (2011), utilizaram um método de determinação de hidroxiprolina baseado na construção de curvas padrão. Dettmer (2012), e Dettmer *et al.* (2012a, 2012b, 2012c), utilizaram o método desenvolvido

pelo Instituto FILK (Forschungsinstitut für Leder und Kunststoffbahnen, Freiberg, Alemanha, 2009 - trabalho não publicado), para a determinação de hidroxiprolina nos banhos residuais.

Neste trabalho, além da estimativa de proteoglicanos, glicosaminoglicanos e hidroxiprolina, os banhos residuais também foram avaliados através da determinação de nitrogênio total, sólidos dissolvidos totais, fixos e voláteis.

Outra prática comum de avaliação dos processos enzimáticos e oxidativos na depilação de peles é a aplicação de testes mecânicos (resistência à tração, ao alongamento e ao rasgamento) ao couro obtido ao final do processo (DETTMER *et al.*, 2012c; MARSAL *et al.*, 1999; MARMER *et al.*, 2003; GEHRING *et al.*, 2003 e 2006; SHI *et al.*, 2003; SUNDAR *et al.*, 2006).

Capítulo 3

Materiais e Métodos

Neste capítulo é feita a descrição das etapas envolvidas na realização da parte experimental deste trabalho. Inicialmente serão apresentados os materiais utilizados nos experimentos. Na sequência são apresentadas as formulações utilizadas nos ensaios e, por fim, os métodos de análises realizados para avaliação dos testes. O trabalho foi realizado no Laboratório de Estudos em Couro e Meio Ambiente (LACOURO), no Departamento de Engenharia Química (DEQUI) da UFRGS.

3.1 Pele

Para a realização deste trabalho utilizou-se uma pele bovina salgada e pré-descarnada, proveniente do grupo Bom Retiro, localizado na cidade de Teutônia, Rio Grande do Sul.

A Figura 3 representa uma pele bovina, onde a ilustração da esquerda mostra as principais regiões da pele e a imagem da direita apresenta a divisão da pele ao meio. Alguns curtumes trabalham com as peles divididas para facilitar o manuseio e o processamento.

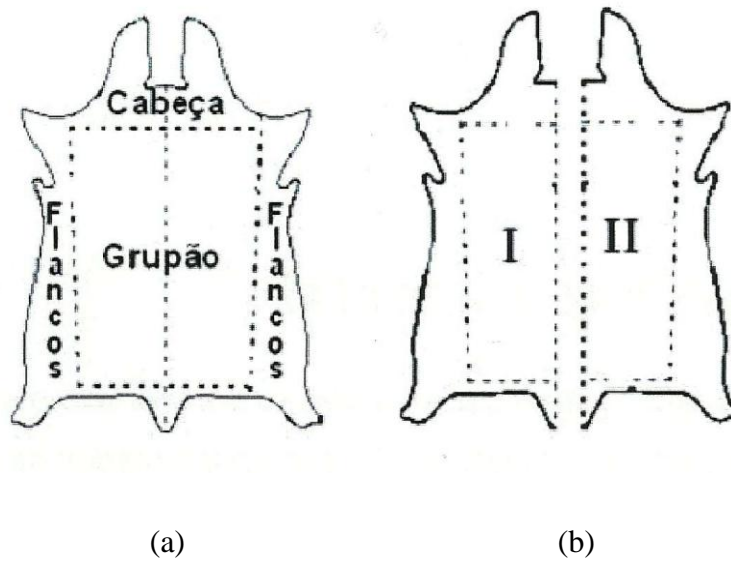


Figura 3: Esquema de uma pele bovina. (a) Principais regiões; (b) Pele dividida em duas metades. Fonte: Souza (2010)

Para a produção dos couros a região central que inclui o grupão é a mais importante, pois é uma grande região com propriedades homogêneas. A Figura 4 apresenta a pele utilizada nos experimentos.



Figura 4: Fotografias da pele utilizada nos testes.

Após a retirada dos flancos, ancas e cabeça, a região restante apresentou uma área de aproximadamente 2,70 m². Esta pele foi, então, cortada ao meio, sendo que uma faixa central, de aproximadamente 10 cm, foi desprezada, visto que esta faixa da linha dorsal apresenta uma rigidez maior.

Cada meia pele foi dividida transversalmente em três partes: superior, meio e inferior. As partes superior e inferior foram depois cortadas de forma a fornecer os pedaços menores de 10 cm x 10 cm (100 cm²), e a parte central (meio) forneceu os pedaços maiores, de 10 cm x 20 cm (200 cm²).

Cada ensaio foi realizado utilizando três pedaços de pele, um da parte superior, um do meio e um da parte inferior. Os pedaços, depois de separados e identificados, foram armazenados sob refrigeração até o momento dos testes.

3.2 Enzimas

As enzimas utilizadas nos testes de depilação realizados neste trabalho foram produzidas por linhagens de *Bacillus subtilis*, isoladas e selecionadas por Dettmer (2012).

Dettmer *et al.* (2012a e 2012b), isolaram duas novas linhagens de *Bacillus subtilis* produtoras de proteases, selecionadas do lodo aeróbico de um curtume. Estas linhagens foram identificadas como BLBc 11 e BLBc 17. A BLBc 11 foi selecionada por apresentar menor atividade sobre o *azocoll*, o que indica menor efeito sobre o colagênio, e a BLBc 17 foi selecionada por apresentar maior atividade sobre *keratin azure*, ou seja, maior efeito sobre a queratina. A atividade proteolítica destas cepas pode ser evidenciada pela formação de halo translúcido no cultivo destas bactérias em placas. A Figura 5 mostra a formação do halo translúcido para o cultivo em placas para a BLBc 11 e BLBc 17.

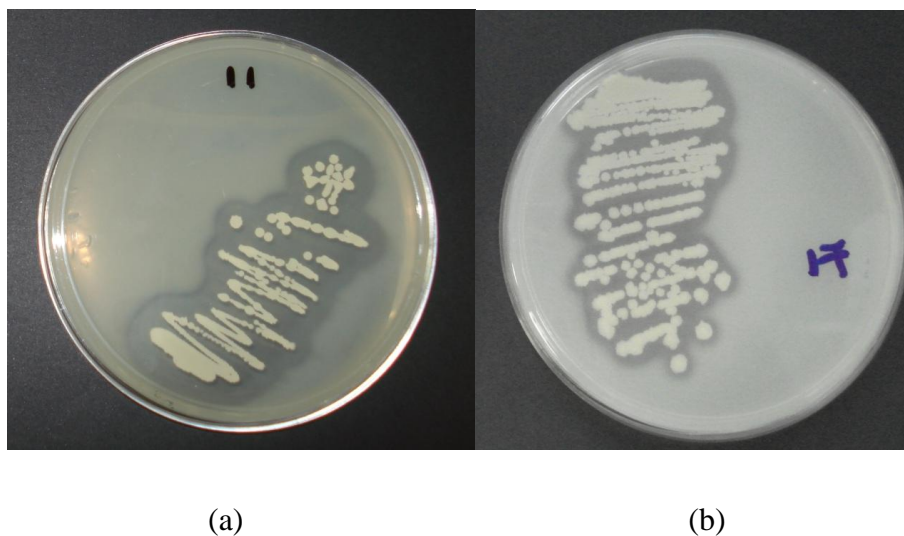


Figura 5: Cultivo em placa das cepas de *Bacillus subtilis*: (a) BLBc 11 e (b) BLBc 17.

Para o cultivo destas linhagens de *Bacillus subtilis* em placas de Petri foi utilizado o meio Luria-Bertani com ágar e 1% de leite desnatado. As placas foram incubadas por 48 horas a 37 °C, e a atividade proteolítica foi, então, evidenciada pela formação do halo translúcido ao redor das colônias. A formação deste halo é devido à ação proteolítica dos microrganismos sobre as proteínas do leite.

A produção de enzimas foi realizada com a inoculação de colônias de células bacterianas em erlenmeyers (250 mL), contendo 100 mL de meio otimizado, ou em erlenmeyers (1000 mL), contendo 400 mL de meio otimizado, cuja composição é peptona (0,1%), farelo de soja (1,4%), extrato de levedura (0,2%), K₂HPO₄ (0,7%) e KH₂PO₄ (0,3%). Os frascos foram incubados a 37°C em um shaker a 80 rpm. Depois de atingida a densidade ótica (DO, 600nm) 1,0, estas culturas foram usadas para inocular os frascos de produção a 10% (v/v) do volume final a ser produzido. Em seguida, os frascos de produção foram cultivados, também, a 37 °C em um shaker a 80 rpm, por 48 horas e então centrifugados (5000 rpm, 4 °C, 10 minutos) para obtenção da enzima. Após a centrifugação, o sobrenadante (rico em enzimas) foi coletado e sua atividade enzimática determinada.

A determinação da atividade proteolítica usando azocaseína como substrato foi baseada em Goingo *et al.* (2007) e em Dettmer *et al.* (2012a e 2012b). A mistura de reação contém 100 µL de substrato (azocaseína 10 mg mL⁻¹), 100 µL de tampão (pH 9,0), e 100 µL de solução enzimática. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C, a reação foi interrompida adicionando 500 µL de solução de TCA (ácido tricloroacético) 10%. Após centrifugação a 10.000 g por 5 minutos, 800 µl do sobrenadante foram adicionados a 200 µL de solução de NaOH 1,8 N. A leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 420 nm. Uma unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,01 a 420 nm nas condições de tempo e temperatura do teste. O controle é realizado adicionando-se as mesmas quantidades de solução enzimática, tampão e substrato ao TCA. As análises foram feitas em triplicata.

3.3 Testes de depilação

Os ensaios foram conduzidos em um sistema (bateria) de fulões (Figura 6), com controle de temperatura e rotação. Os testes foram realizados em bateladas de acordo com o

tamanho das amostras e capacidade do equipamento. As condições de operação dos fulões, durante todos os experimentos (lavagem e remolho, e testes de depilação), foram mantidas constantes, com rotação de 13 rpm, e trabalhando-se à temperatura ambiente. A temperatura ambiente foi mantida em torno de 25 °C.



Figura 6: Bateria de fulões utilizado nos experimentos.

A parte experimental teve início com a preparação da pele, descrita no item 3.1. A pele foi dividida em duas metades, sendo o lado I destinado para testes do processo de depilação com as enzimas produzidas pela linhagem BLBc 11, e o lado II, usado com as enzimas produzidas pela BLBc 17. Após a remoção do sal, por meio de raspagem, as peles foram devidamente lavadas e remolhadas, seguindo a formulação, baseada em processos industriais, descrita na Tabela 1.

Tabela 1: Formulação utilizada nas etapas de lavagem e remolho.

Etapa	Produtos	Quantidade *	Tempo
Lavagem	Água	200%	15 minutos esgotar o banho
Remolho	Água	200%	3 horas esgotar o banho
	Carbonato de sódio Eusapon® L-DE	0,30% 0,15%	

* Percentuais mássicos aplicados sobre o peso da pele

A função do carbonato de sódio no processo de remolho é aumentar a velocidade da reidratação por meio do efeito osmótico e formar sabões com os ácidos graxos da pele. O Eusapon® L-DE auxilia o desengraxe das peles e a emulsificação das gorduras naturais.

A depilação, etapa posterior à lavagem e ao remolho, é a etapa do processamento de peles foco deste trabalho. Nesta etapa foram utilizadas as enzimas produzidas pelas linhagens de *Bacillus subtilis*, BLBc 11 e BLBc 17, em associação com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Ou seja, o presente trabalho propõe uma depilação enzimática-oxidativa, alternativa ao processo comumente usado nos curtumes, onde se utiliza cal e sulfeto de sódio.

A quantidade de enzima a ser utilizada nos testes foi calculada a partir da atividade proteolítica da enzima a ser aplicada. Esta quantidade depende da massa de pele e da concentração de enzima desejada para cada ensaio. A concentração de enzima, portanto, foi medida em unidades enzimáticas por grama de pele (U g⁻¹).

As enzimas foram aplicadas à temperatura ambiente. Nos ensaios de depilação enzimática-oxidativa, a etapa enzimática foi realizada sem alteração do pH, porém a partir da etapa de alcalinização (necessária para a realização da etapa oxidativa), o pH do banho tornou-se alcalino, apresentando valores em torno de 12 ao final dos experimentos. De acordo com estudos anteriores de Dettmer *et al.* (2012a e 2012b), as enzimas produzidas pela linhagens BLBc 11 e BLBc 17, neste valor de pH, não são inativadas, no entanto apresentam redução de sua atividade proteolítica residual.

Na etapa de alcalinização foi utilizado hidróxido de sódio (NaOH) em lentilhas, e a etapa oxidativa foi realizada com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), 35%.

3.3.1 Imunização, alcalinização e ordem das etapas (enzimática/oxidativa)

A fim de se determinar as melhores condições de trabalho, foram realizados alguns testes com as enzimas produzidas pela linhagem de *Bacillus subtilis* BLBc 11.

Nos primeiros testes foram avaliadas a imunização com hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂), a alcalinização com hidróxido de sódio (NaOH) e a ordem das etapas (enzimática/oxidativa). Para a realização destes experimentos, as concentrações de enzima e de peróxido de hidrogênio foram mantidas em 300 U g⁻¹ de pele e 8%, respectivamente.

Foram alteradas as ordens das etapas de depilação (antes ou após a etapa oxidativa), e avaliou-se, também, a imunização prévia dos pelos com o uso de hidróxido de cálcio ou da alcalinização do meio com hidróxido de sódio, realizada sempre antes da etapa oxidativa. Foram utilizadas 4 formulações diferentes (4 testes), conforme descrito na Tabela 2.

Os testes 1 e 2 os foram realizados sem prévia imunização dos pelos com hidróxido de cálcio. No teste 1 foi realizada, primeiramente, a alcalinização do banho, a seguir iniciou-se a etapa oxidativa e, por fim a etapa enzimática. No teste 2 foi realizada, inicialmente, a etapa enzimática, a seguir a alcalinização do meio e a etapa oxidativa. Nos testes 3 e 4 fez-se, primeiramente, a imunização dos pelos com hidróxido de cálcio, sem alcalinização do meio. No teste 3 foi realizada a etapa oxidativa, seguida pela etapa enzimática. No teste 4, por sua vez, foi realizada a etapa enzimática, seguida da etapa oxidativa. Ao final dos ensaios, as peles foram visualmente avaliadas.

Tabela 2: Formulações utilizadas na primeira batelada de testes.

Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4
com alcalinização e sem imunização		com imunização e sem alcalinização	
200% de água	200% de água	100 % de água	100% de água
2 % de NaOH	300 U g ⁻¹ de pele	1% Ca(OH)₂	1% Ca(OH)₂
10 minutos	3 horas	15 minutos	15 minutos
8 % sol. H ₂ O ₂	2% de NaOH	100% de água	100% de água
3 horas	10 minutos	8% sol. H ₂ O ₂	300 U g ⁻¹ de pele
		3 horas	3 horas
300 U g ⁻¹ de pele	8% sol. H ₂ O ₂	300 U g ⁻¹ de pele	8% sol. H ₂ O ₂
3 horas	3 horas	3 horas	3 horas

■ Etapa enzimática
 ■ Etapa oxidativa

As porcentagens dos reagentes utilizados nas formulações são baseadas no peso da pele.

Nestes testes verificou-se que a alcalinização do meio com NaOH apresentou os melhores resultados, portanto a partir destes experimentos não foi realizada a imunização dos pelos com hidróxido de cálcio. Verificou-se, também, que a depilação realizada primeiramente com uso de enzimas, favoreceu a depilação.

3.3.2 Determinação da concentração de NaOH

Na segunda batelada de experimentos foi realizada a depilação enzimática como primeira etapa, sendo aplicado somente o extrato enzimático produzido através do cultivo da BLBc 11. Foram testadas duas concentrações de enzima, 100 U g^{-1} de pele e 300 U g^{-1} de pele. A seguir, foram adicionados água e NaOH para alcalinização, sendo que a concentração deste reagente foi reduzida de 2% (utilizada nos testes anteriores), para 1%. E, por fim, foi realizada a etapa oxidativa, com duas concentrações diferentes de peróxido de hidrogênio, 4% e 8%. No teste 1 foram testadas as concentrações mais baixas de enzima e peróxido de hidrogênio, e no teste 2, as concentrações mais altas. A formulação testada na segunda batelada de testes encontra-se na Tabela 3. Ao final dos experimentos, as peles foram visualmente avaliadas.

Tabela 3. Formulação utilizada na segunda batelada de testes.

Teste 1	Teste 2
100 U g^{-1} de pele	300 U g^{-1} de pele
2 horas	2 horas
200% H_2O	200% H_2O
1% NaOH	1% NaOH
10 minutos	10 minutos
4% sol. H_2O_2	8 % sol. H_2O_2
2 horas	2 horas

■ Etapa enzimática
 ■ Etapa oxidativa

Quantidade de reagentes baseada nos percentuais mássicos aplicados sobre o peso das peles.

A fim de se avaliar uma concentração mais baixa de NaOH na etapa de alcalinização, em diferentes concentrações de enzima e peróxido de hidrogênio, na terceira batelada de testes trabalhou-se nas concentrações de enzima de 100 U g^{-1} de pele e 300 U g^{-1} de pele. O peróxido de hidrogênio foi utilizado nas concentrações de 4% e 8%. Já a concentração de hidróxido de sódio foi reduzida para 0,5%. A formulação utilizada nestes testes encontra-se na Tabela 4.

Nos testes 1 e 2 a etapa enzimática foi realizada na concentração de enzima de 100 U g^{-1} de pele, a seguir foram adicionados água e hidróxido de sódio, para a etapa de alcalinização, após foi adicionado o peróxido de hidrogênio, nas concentrações de 4% no teste

1, e 8% no teste 2. Nos testes 3 e 4 a etapa enzimática foi realizada na concentração de 300 U g⁻¹ de pele, após foram adicionados água e hidróxido de sódio, para a alcalinização, a seguir foi adicionado peróxido de hidrogênio, nas concentrações de 4% no teste 3, e 8% no teste 4. Ao término dos experimentos, as peles foram visualmente avaliadas.

Tabela 4. Formulação utilizada na terceira batelada de testes.

Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4
100 U g ⁻¹ de pele 2 horas	100 U g ⁻¹ de pele 2 horas	300 U g ⁻¹ de pele 2 horas	300 U g ⁻¹ de pele 2 horas
200% de H ₂ O	200% de H ₂ O	200% de H ₂ O	200% de H ₂ O
0,5% de NaOH 10 minutos	0,5% de NaOH 10 minutos	0,5% de NaOH 10 minutos	0,5% de NaOH 10 minutos
4% sol. H ₂ O ₂ 2 horas	8% sol. H ₂ O ₂ 2 horas	4% sol. H ₂ O ₂ 2 horas	8% sol. H ₂ O ₂ 2 horas

■ Etapa enzimática
 ■ Etapa oxidativa

3.3.3 Procedimento experimental – Depilação enzimática-oxidativa

Pela observação dos resultados dos testes iniciais, verificou-se que a alcalinização do meio com NaOH apresentou melhores resultados que a imunização dos pelos com Ca(OH)₂, e que uma concentração de 1% de NaOH seria uma concentração de uso aceitável, pois favoreceu a depilação oxidativa e não deixou a pele amarelada como ocorreu quando foram utilizados 2% deste reagente, já o uso de 0,5% de NaOH não favoreceu a depilação. Verificou-se que fazer a depilação enzimática como primeira etapa, adicionando-se apenas o extrato enzimático, foi a melhor opção. E, que um tempo de 4 horas (2 horas – depilação enzimática + 2 horas – depilação oxidativa), poderia ser um tempo de processo aceitável para evitar o amarelamento da pele, o ataque da enzima à camada flor e a possível degradação dos pelos pelo peróxido de hidrogênio.

Foram, então, definidos os parâmetros fixos, ou seja, constantes ao longo da depilação, e os parâmetros variáveis.

Os parâmetros fixos foram:

- Concentração de hidróxido de sódio: 1%
- Temperatura: ambiente (em torno de 25 °C)
- Ordem das etapas: 1º etapa: enzimática; 2º etapa: oxidativa

- Tempo de processo: 2 horas: enzimática + 2 horas: oxidativa

Os parâmetros variáveis e, portanto, avaliados durante os testes de depilação enzimática-oxidativa foram: o tipo de enzima, a concentração de enzima e a concentração de peróxido de hidrogênio.

Assim, foram testadas as variações de formulação descritas da Tabela 5 (testes 1, 2, 3 e 4), como o procedimento a ser seguido nos ensaios de depilação. O objetivo dos testes foi avaliar efeito dos dois tipos de enzima utilizados (BLBc 11 e BLBc 17), a concentração de enzima e a concentração de peróxido de hidrogênio na depilação de peles bovinas. Testaram-se duas concentrações de enzima (100 U g^{-1} de pele e 300 U g^{-1} de pele) e duas concentrações de peróxido de hidrogênio (4% e 8%). Os ensaios de depilação enzimática-oxidativa foram realizados em duplicata.

Tabela 5. Formulação utilizada nos ensaios de depilação

Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4	Processo Enzimático*
Conc. de enzima (BLBc 11 ou BLBc 17): 100 U g^{-1} de pele 2 horas	Conc. de enzima (BLBc 11 ou BLBc 17): 100 U g^{-1} de pele 2 horas	Conc. de enzima (BLBc 11 ou BLBc 17): 300 U g^{-1} de pele 2 horas	Conc. de enzima (BLBc 11 ou BLBc 17): 300 U g^{-1} de pele 2 horas	Conc. de enzima (BLBc 11 ou BLBc 17): 300 U g^{-1} de pele 6 horas
200% H ₂ O	200% H ₂ O	200% H ₂ O	200% H ₂ O	
1% NaOH	1% NaOH	1% NaOH	1% NaOH	
10 minutos	10 minutos	10 minutos	10 minutos	
4% H ₂ O ₂ 2 horas	8% H ₂ O ₂ 2 horas	4% H ₂ O ₂ 2 horas	8% H ₂ O ₂ 2 horas	

*processo puramente enzimático realizado para fins comparativos.

■ Etapa enzimática
 ■ Etapa oxidativa

As porcentagens de reagentes utilizados são baseadas no peso da pele.

Foram realizados, também, testes comparativos, onde a depilação proposta foi comparada com o processo convencional de depilação, com uso do sistema cal-sulfeto de

sódio, e com a depilação somente enzimática, onde o extrato enzimático, na concentração de 300 U g⁻¹ de pele, foi aplicado diretamente nas peles, sem qualquer adição de outro produto químico, por um período de 6 horas.

A Tabela 6 detalha a formulação utilizada na depilação convencional, com uso de cal e sulfeto de sódio.

Tabela 6. Formulação utilizada na depilação com cal e sulfeto de sódio

Produtos	Percentual	Tempo
Água	50,00%	
Cal	1,00%	
Eusapon® L-DE	0,16%	60 min
Sulfeto de sódio	1,00%	
Cal	0,50%	45 min
Sulfeto de sódio	1,50%	
Cal	0,50%	60 min
Cal	2,00%	
Eusapon® L-DE	0,04%	
Água	150,00%	90 min
		15 horas

A quantidade de produtos foi baseada nos percentuais mássicos aplicados sobre o peso da pele. Esta formulação é baseada nas formulações utilizadas em curtumes.

3.4 Métodos analíticos

As peles, depois de submetidas aos ensaios de depilação, foram avaliadas visualmente, a olho nu e com ampliação de 12 vezes. A ampliação foi realizada com o uso de uma lupa com iluminação, TOYO – TL -1000.

Os banhos residuais, recolhidos ao final dos testes de depilação, foram avaliados através de análises de pH, sólidos dissolvidos totais, fixos e voláteis, nitrogênio total (NTK), glicosaminoglicanos, proteoglicanos e hidroxiprolina.

O pH é um parâmetro importante para avaliar a alcalinidade dos banhos. O pH dos banhos foi medido imediatamente ao final dos ensaios.

Os sólidos dissolvidos totais (SDT) remetem a pequenas moléculas orgânicas, sujeiras presentes na pele, sais dissolvidos no banho, entre outros. Elevado teor de sólidos fixos (SDF) significa efluente com elevada carga inorgânica, enquanto que elevado teor de sólidos voláteis (SDV) está relacionado à alta carga orgânica no efluente.

A determinação do teor de sólidos dissolvidos totais, fixos e voláteis foi realizada de acordo com o método baseado na norma NBR 14550 da ABNT. A análise de sólidos dissolvidos totais é realizada com a adição de 25 mL de amostra de banho, homogeneizada e filtrada, a uma cápsula de porcelana contendo areia calcinada. Às cápsulas, previamente taradas, devem-se adicionar areia calcinada (20 g), e estas então devem ser deixadas na estufa a 105 °C por uma hora, após tirar, esfriar em dessecador e anotar o resultado, adicionando-se então a amostra. As cápsulas são então levadas à estufa (105 °C) e deixadas de um dia para o outro ou até peso constante. Ao final, as cápsulas são esfriadas em dessecador, e ao atingir a temperatura ambiente, são pesadas e o resultado anotado. Para a análise de sólidos dissolvidos fixos, as cápsulas utilizadas na análise de sólidos dissolvidos totais são levadas para a mufla à temperatura de 550 °C – 600 °C por duas horas. O resultado da análise de sólidos dissolvidos voláteis é obtido indiretamente da diferença entre os dois resultados anteriores.

A determinação de glicosaminoglicanos e proteoglicanos é importante para avaliar a remoção destas proteínas interfibrilares. A remoção destas proteínas propicia a necessária abertura das fibras, facilitando a difusão dos produtos utilizados nas etapas posteriores à depilação. A remoção eficaz e adequada de proteoglicanos garante características como flexibilidade e maciez ao couro.

A determinação de proteoglicanos, de glicosaminoglicanos e de hidroxiprolina nos banhos foi realizada através de métodos que se baseiam na construção de curvas padrão.

Na determinação de proteoglicanos toma-se 1 mL da amostra de banho, mistura-se com 100 µL de solução fresca de ácido periódico e incuba-se a 37 °C por 2 horas. Depois, são adicionados 100 µL do reagente de Schiff (descolorido), mistura-se e deixa-se, por no mínimo, 30 minutos na temperatura ambiente. A curva padrão é obtida usando a mucina como

padrão. A absorvância é medida a 555 nm. Este método é baseado no trabalho de Madhan *et al.* (2010).

A determinação de glicosaminoglicanos é realizada através do ensaio da modificação do azul de dimetilmetileno, que é específico para quantificação de glicosaminoglicanos sulfatados. Para a análise, 100 µL de cada amostra de banho e 2,5 mL de reagente colorido de azul de dimetilmetileno são misturados e transferidos para as respectivas cubetas. A absorvância em 525 nm deve ser imediatamente lida no espectrofotômetro. A curva padrão é obtida com o uso de sulfato de condroitina como padrão. Método baseado no trabalho Madhan *et al.* (2010).

Os métodos de determinação de proteoglicanos e glicosaminoglicanos citados, também foram utilizados nos trabalhos de Dettmer (2012) e Dettmer *et al.* (2012a, 2012b, 2012c).

A determinação de hidroxiprolina nos banhos residuais é importante para avaliar o ataque ao colágeno, principal proteína de peles animais, e que deve ser preservada.

O conteúdo de hidroxiprolina nos banhos foi determinado pelo método desenvolvido pelo Instituto FILK (Forschungsinstitut für Leder und Kunststoffbahnen, Freiberg, Alemanha, 2009 - trabalho não publicado), também utilizado nos trabalhos de Dettmer (2012) e Dettmer *et al.* (2012a, 2012b, 2012c).

O nitrogênio NTK é uma forma de quantificar a matéria orgânica (com exceção a lipídeos, que não possuem nitrogênio em sua composição).

A análise de nitrogênio total Kjeldahl foi realizada de acordo com o procedimento adaptado da Norma ASTM D2868 – 10. Este método consiste na digestão completa de 25 mL de amostra em 18 mL de ácido sulfúrico concentrado, na presença de uma mistura catalítica composta por sulfato de potássio e sulfato de cobre (10 g), em alta temperatura (300 °C). A completa digestão das amostras se verifica quando estas se tornam translúcidas. As amostras foram digeridas no digestor modelo DK20 (Velp Scientific) com capacidade para vinte amostras. Depois de digeridas e resfriadas, fez-se a destilação das mesmas com solução de hidróxido de sódio a 40%, no destilador modelo UDK 129 (Velp Scientific). O nitrogênio é destilado para uma solução indicadora de ácido bórico (125 mL) até alcançar aproximadamente 200 mL. Durante a destilação esta solução torna-se verde indicando a

presença do nitrogênio. A solução é, então, titulada com ácido sulfúrico diluído até a viragem de verde para violeta.

Capítulo 4

Resultados e discussão

Este capítulo é destinado à apresentação e discussão dos resultados experimentais obtidos. Primeiramente, são apresentados os resultados da análise visual das peles dos testes de depilação, bem como a visualização dos pelos removidos, para checar se o método de depilação proposto não degrada os pelos. Após são apresentados e discutidos os resultados analíticos obtidos a partir da análise dos banhos.

4.1 Avaliação das peles

As peles ao final dos testes de depilação foram avaliadas visualmente a olho nu e por ampliação (12 vezes).

4.1.1 Imunização, alcalinização e ordem das etapas (enzimática/oxidativa)

Nos primeiros experimentos verificou-se a imunização com hidróxido de cálcio, a alcalinização com hidróxido de sódio e a ordem das etapas, seguindo as formulações descritas na Tabela 2, apresentada no item 3.3.1 do capítulo 3.

Os resultados da primeira batelada de testes estão ilustrados na Figura 7. Verifica-se a remoção de pelos em todos os testes, sendo que no primeiro teste, esta remoção foi menor, e que os pelos ficaram amarelados. A melhor opção de depilação foi a realizada no teste 2 que consiste na realização, primeiramente, da etapa enzimática com posterior alcalinização do meio com NaOH e realização da etapa oxidativa, onde praticamente, todo o pelo foi removido. Nos testes 3 e 4, onde foi realizada a prévia imunização dos pelos com hidróxido

de cálcio, verifica-se a não remoção completa dos pelos. Embora a remoção não tenha sido completa em nenhum dos experimentos, verificou-se o afrouxamento dos pelos, percebendo-se que estes poderiam ser facilmente removidos mecanicamente, com o auxílio de uma pinça ou pela raspagem da pele com uma espátula. Sendo assim, procedeu-se a raspagem das peles para remoção dos pelos ainda remanescentes após os testes. Imagens das peles limpas fisicamente encontram-se na Figura 8.

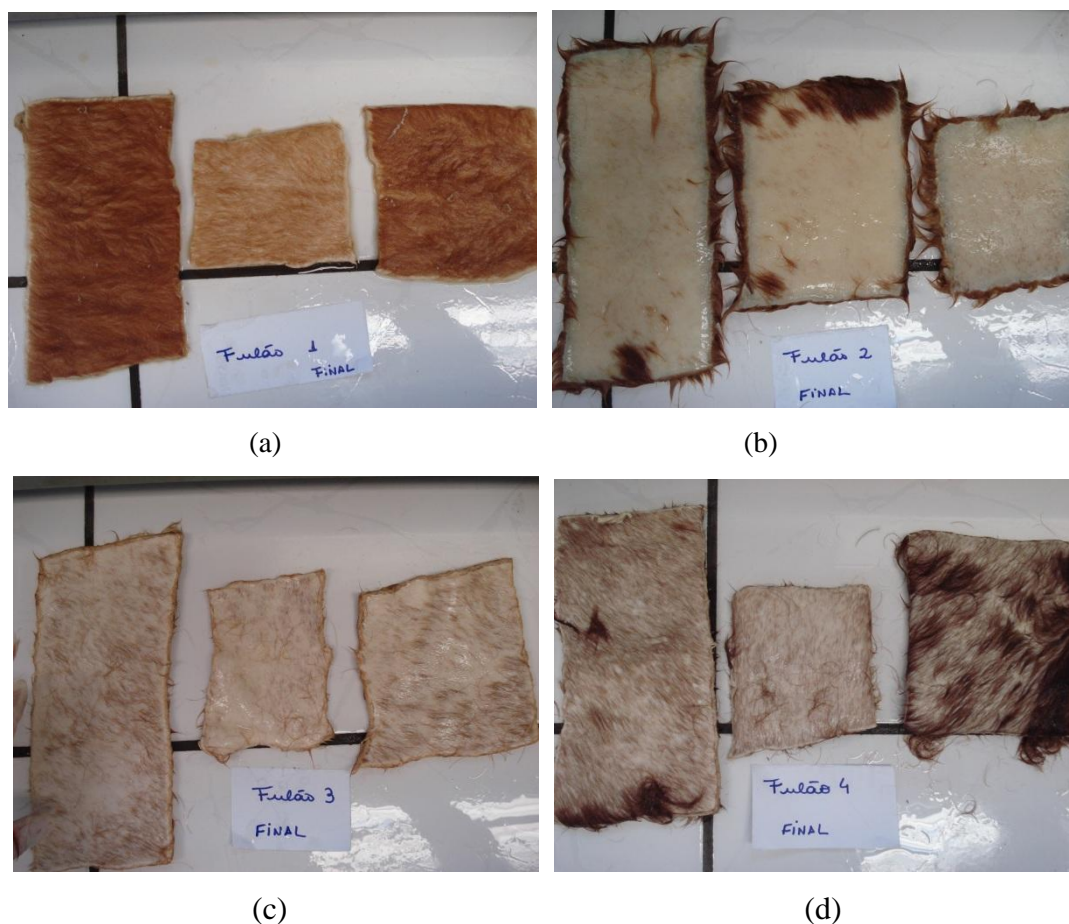


Figura 7: Análise visual das peles ao final dos experimentos onde foram avaliados a imunização com Ca(OH)_2 , a alcalinização com NaOH e a ordem das etapas (oxidativa/enzimática). (a) Teste 1: sem imunização, alcalinização com NaOH , primeira etapa oxidativa; (b) Teste 2: sem imunização, alcalinização com NaOH , primeira etapa enzimática; (c) Teste 3: imunização com Ca(OH)_2 , sem alcalinização, primeira etapa oxidativa; (d) Teste 4: imunização com Ca(OH)_2 , sem alcalinização, primeira etapa enzimática.

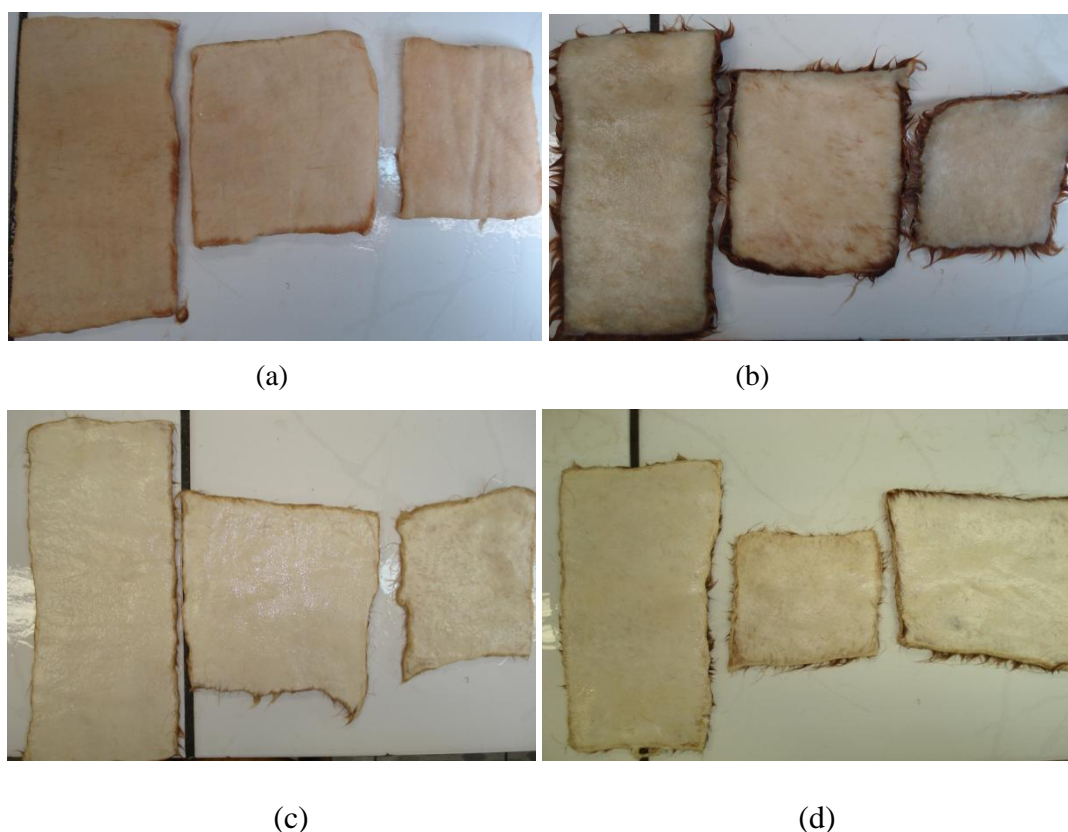


Figura 8. Análise visual das peles após remoção mecânica dos pelos (raspagem). (a) Teste 1: sem imunização, alcalinização com NaOH, primeira etapa oxidativa; (b) Teste 2: sem imunização, alcalinização com NaOH, primeira etapa enzimática; (c) Teste 3: imunização com $\text{Ca}(\text{OH})_2$, sem alcalinização, primeira etapa oxidativa; (d) Teste 4: imunização com $\text{Ca}(\text{OH})_2$, sem alcalinização, primeira etapa enzimática.

4.1.2 Determinação da concentração de NaOH

Encontram-se na Figura 9 os resultados dos experimentos realizados na segunda batelada de testes, onde se avaliou o uso somente do extrato enzimático em diferentes quantidades adicionadas, como primeira etapa, a alcalinização do meio com 1% de hidróxido de sódio, e duas concentrações de peróxido de hidrogênio, seguindo as formulações da Tabela 3 do item 3.3.2 do capítulo anterior. Verifica-se que nos dois ensaios houve remoção de pelos. E, embora a remoção não tenha sido completa para ambos, os pelos remanescentes puderam ser removidos mecanicamente com facilidade, o que pode ser observado na Figura 10.

Pela Figura 10 pode-se observar que nesta batelada de testes os pelos, que não foram removidos durante o experimento, também, puderam ser facilmente removidos

mecanicamente. Verificou-se, também, que os pelos foram removidos com raiz, ou seja, não deixaram resíduos remanescentes nos poros das peles.



(a)

(b)

Figura 9: Peles ao final dos experimentos onde foram avaliados uso de extrato enzimático como primeira etapa, a concentração de NaOH e a concentração de H_2O_2 . (a) Teste 1: concentração de enzima $100 U g^{-1}$ de pele; concentração de peróxido de hidrogênio: 4% (concentração mais baixa); (b) Teste 2: concentração de enzima: $300 U g^{-1}$ de pele; concentração de peróxido de hidrogênio 8% (concentração mais alta).

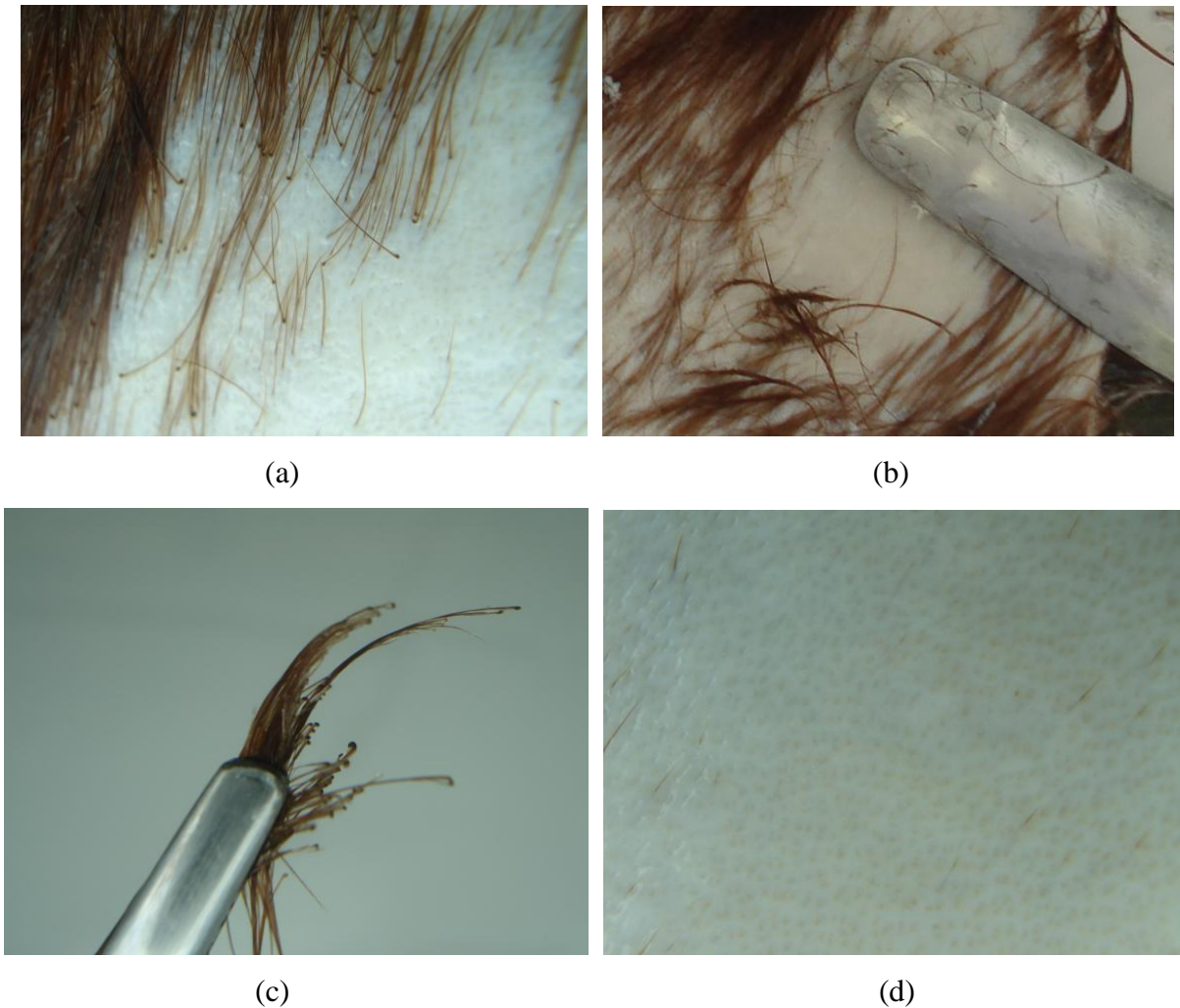


Figura 10: Resultados dos experimentos onde foram avaliados o uso de extrato enzimático como primeira etapa, a concentração de NaOH e a concentração de H_2O_2 . (a) Verificação da soltura dos pelos; (b) Facilidade de remoção dos pelos por ação mecânica (raspagem); (c) Pelos são removidos pela raiz; (d) Pele limpa.

A terceira batelada de testes foi realizada para avaliar duas concentrações de enzima e de peróxido de hidrogênio, e a alcalinização do meio com uma concentração menor de hidróxido de sódio, 0,5%, realizados conforme a Tabela 4 do item 3.3.2. Os resultados destes experimentos encontram-se na Figura 11. Assim como nos testes anteriores, verificou-se que não houve remoção completa dos pelos. Porém, neste caso, os pelos remanescentes não apresentaram a mesma facilidade de remoção dos testes anteriores. Talvez, porque a concentração de hidróxido de sódio não tenha sido suficiente para alcalinizar o banho, o que é uma condição necessária para a etapa oxidativa. Nestes testes, portanto, não foi realizada a raspagem das peles.

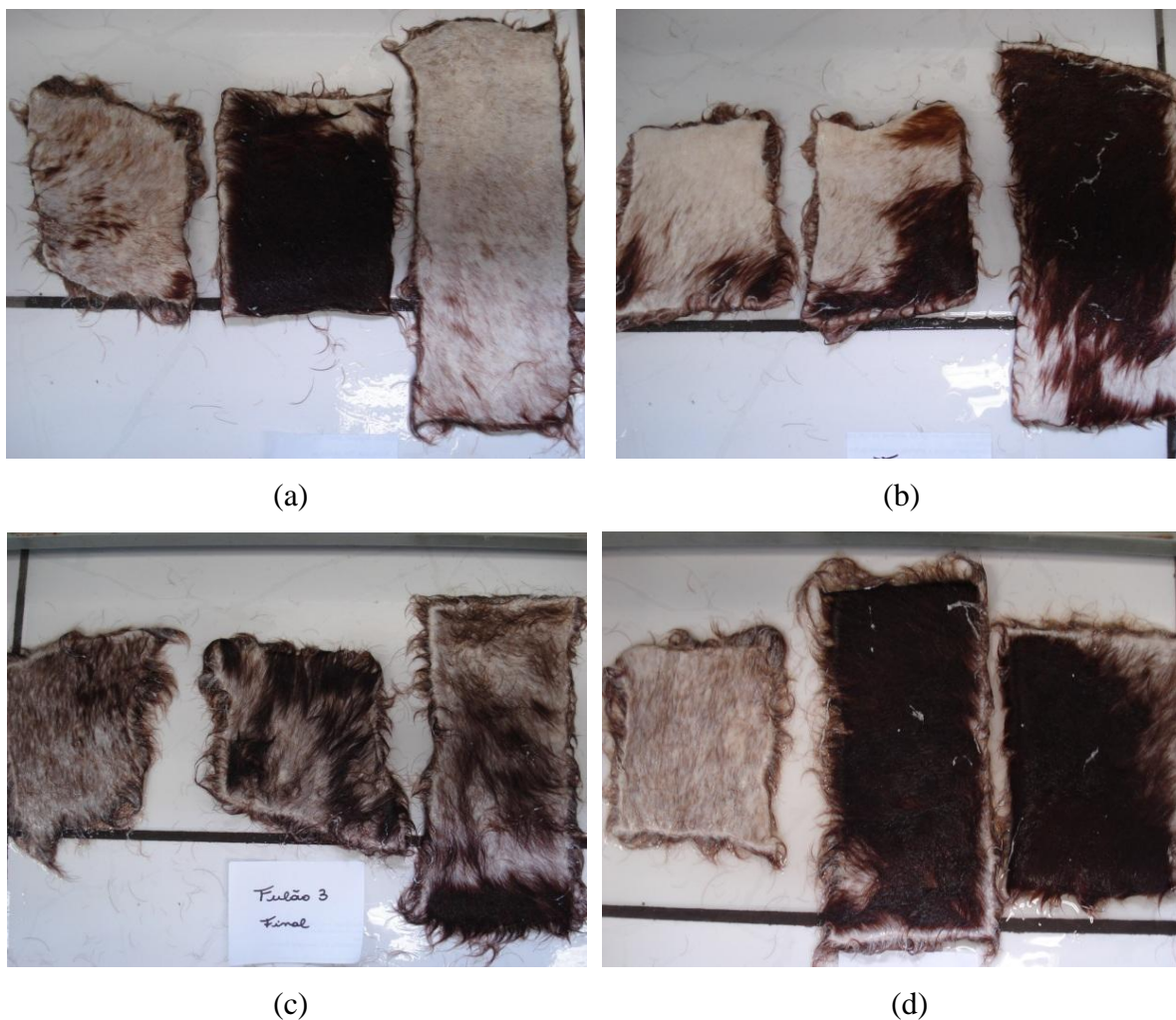


Figura 11: Resultados dos experimentos onde foram avaliadas as concentrações de enzima, de H_2O_2 e de NaOH . (a) Teste 1: concentração de enzima 100 U g^{-1} de pele, e 4% de H_2O_2 ; (b) Teste 2: concentração de enzima 100 U g^{-1} de pele, e 8% de H_2O_2 ; (c) Teste 3: concentração de enzima 300 U g^{-1} de pele, e 4% de H_2O_2 ; (d) Teste 4: concentração de enzima 300 U g^{-1} de pele, e 8% H_2O_2 .

4.1.3 Procedimento experimental – Depilação enzimática-oxidativa

Os ensaios de depilação enzimática-oxidativa foram realizadas em duas bateladas, uma com uso das enzimas produzidas pela linhagem BLBc 11, e outra com o uso das enzimas produzidas pela BLBc 17 na etapa enzimática.

A primeira batelada de testes de depilação foi realizada com o uso das enzimas produzidas pelo cultivo da **BLBc 11** na etapa enzimática do procedimento proposto neste

trabalho. A formulação aplicada está descrita no capítulo anterior, Tabela 5, apresentada no item 3.3.3. A Figura 12 mostra os resultados visuais obtidos ao final dos experimentos.

De acordo com a Figura 12, pode-se visualizar a remoção parcial dos pelos em todos os testes, sendo que no teste 1, concentração de enzima e peróxido mais baixos, 100 U g^{-1} de pele e 4%, respectivamente, a remoção foi menor que nos demais. Porém, verificou-se que os pelos poderiam ser fisicamente removidos. Assim sendo, fez-se a remoção dos pelos mecanicamente (raspagem). A Figura 13 mostra como ficaram as peles após a remoção dos pelos.

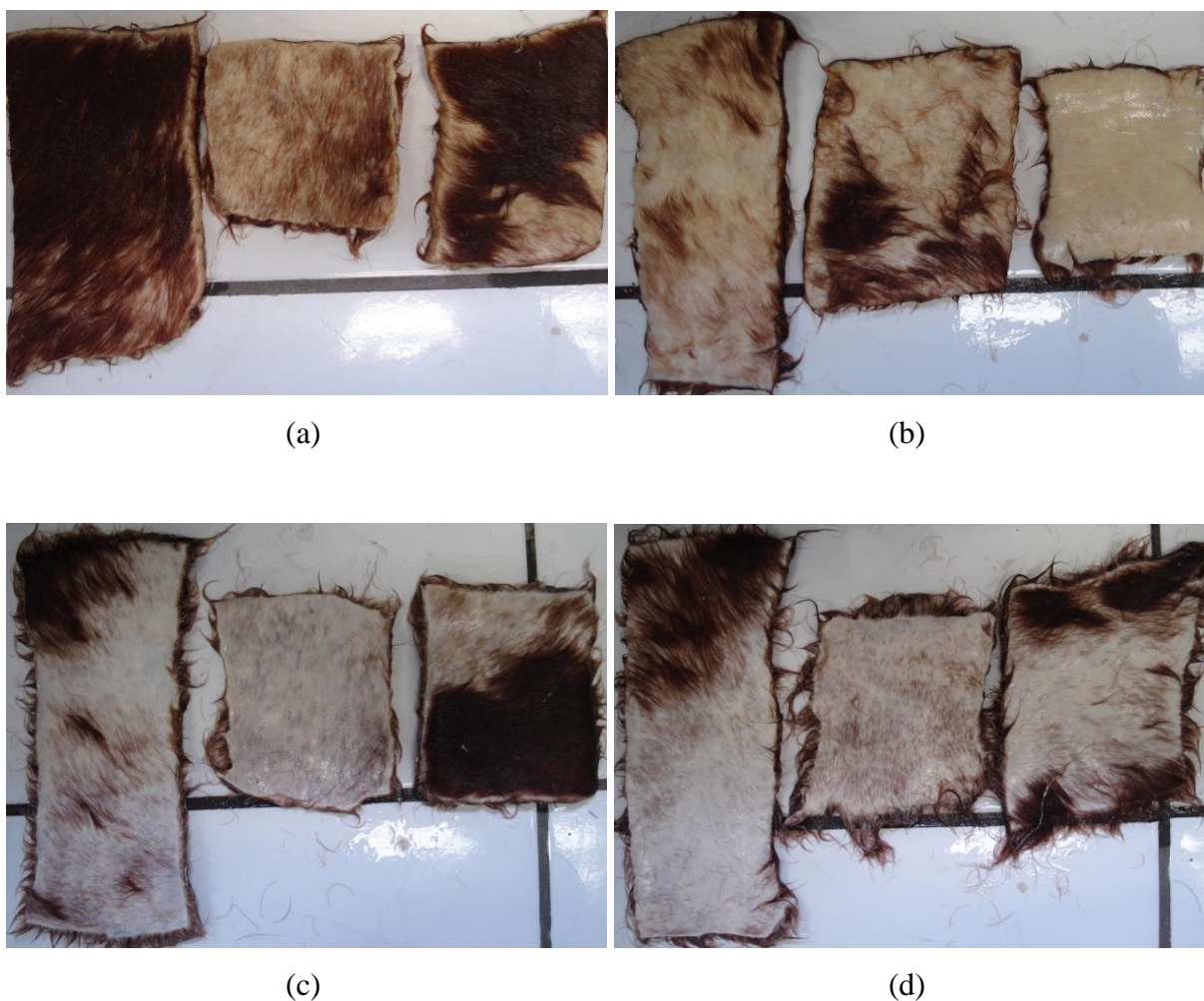


Figura 12: Análise visual das peles ao final dos testes, com uso de enzimas produzidas pela linhagem BLBc 11. (a) Teste 1: concentração de enzima 100 U g^{-1} de pele, e 4% de H_2O_2 ; (b) Teste 2: concentração de enzima 100 U g^{-1} de pele, e 8% de H_2O_2 ; (c) Teste 3: concentração de enzima 300 U g^{-1} de pele, e 4% de H_2O_2 ; (d) Teste 4: concentração de enzima 300 U g^{-1} de pele, e 8% de H_2O_2 .

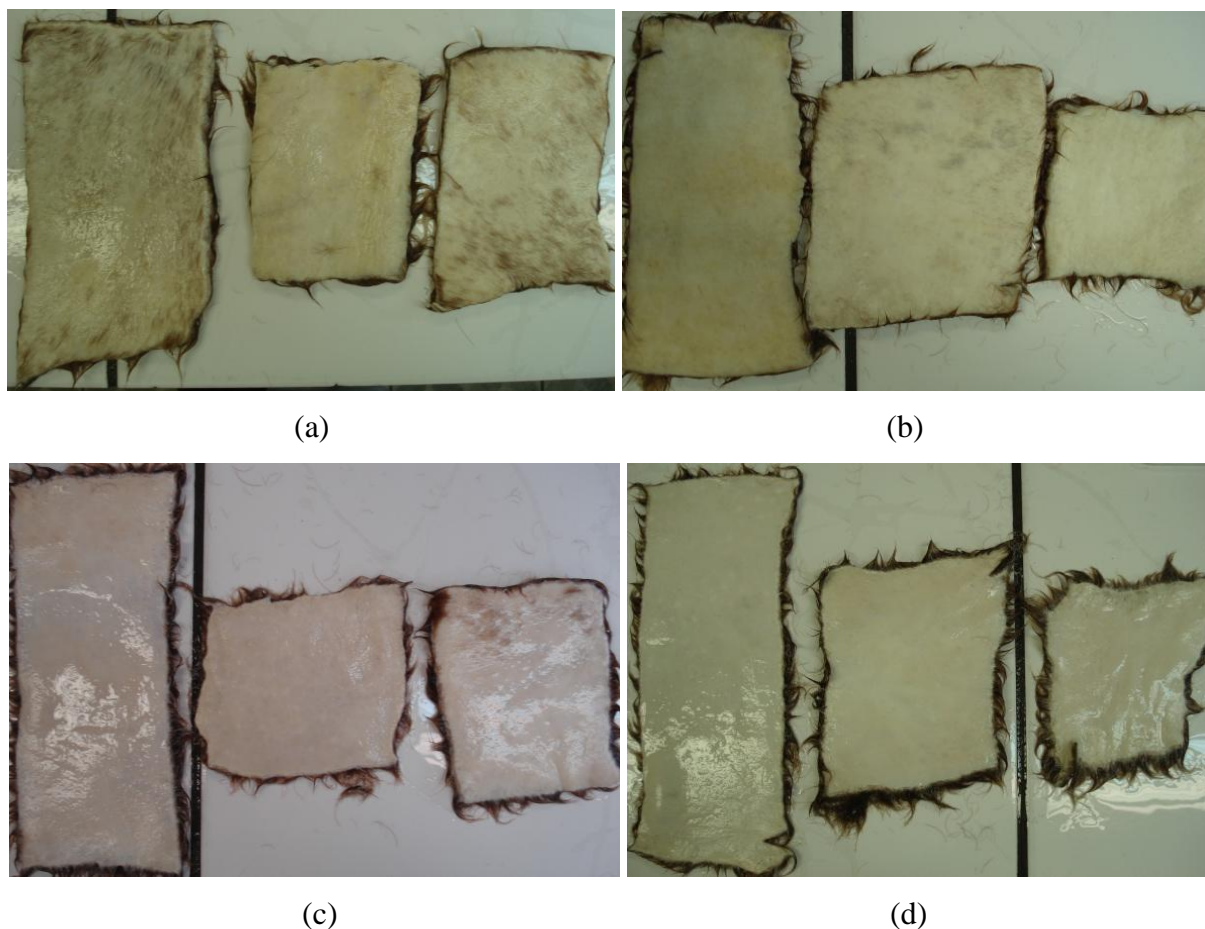


Figura 13: Imagem das peles após remoção mecânica dos pelos. (a) Teste 1: concentração de enzima 100 U g^{-1} de pele, e 4% de H_2O_2 ; (b) Teste 2: concentração de enzima 100 U g^{-1} de pele, e 8% de H_2O_2 ; (c) Teste 3: concentração de enzima 300 U g^{-1} de pele, e 4% de H_2O_2 ; (d) Teste 4: concentração de enzima 300 U g^{-1} de pele, e 8% de H_2O_2 .

Verificou-se que em todos os ensaios, os pelos puderam ser removidos fisicamente, porém as peles em que a depilação enzimática foi realizada com maior concentração de enzima apresentaram melhor eficiência de remoção dos pelos. Após a remoção física dos pelos, as peles foram avaliadas com ampliação de 12 vezes. Os resultados encontram-se na Figura 14.

As imagens mostram que em todos os testes realizados com uso de enzimas produzidas pela linhagem BLBc 11 na etapa enzimática, os poros das peles apresentaram-se limpos ao final da remoção física dos pelos. Como pode ser observado na Figura 15, os pelos foram removidos por inteiro, sem romperem por ataque químico, que é o que ocorre quando a pele é depilada com sulfeto de sódio, fato observado no trabalho de Souza e Gutterres (2012).

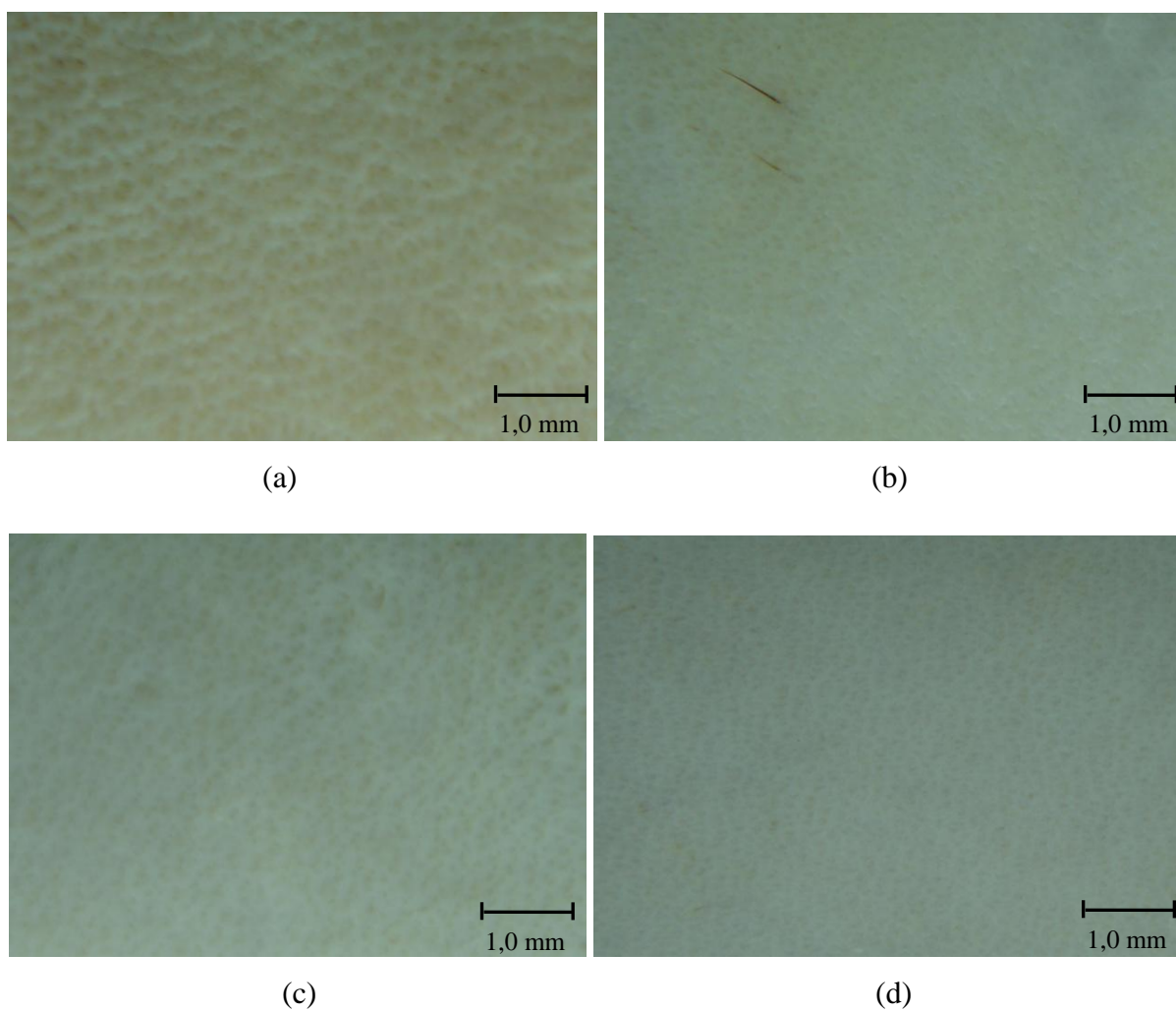


Figura 14: Ampliação das peles após remoção mecânica dos pelos (12 vezes). (a) Teste 1: concentração de enzima 100 U g^{-1} de pele, e 4% de H_2O_2 ; (b) Teste 2: concentração de enzima 100 U g^{-1} de pele, e 8% de H_2O_2 ; (c) Teste 3: concentração de enzima 300 U g^{-1} de pele, e 4% de H_2O_2 ; (d) Teste 4: concentração de enzima 300 U g^{-1} de pele, e 8% de H_2O_2 .



Figura 15: Pelos inteiros removidos pelo processo enzimático-oxidativo de depilação. Etapa enzimática: enzimas produzidas pela linhagem BLBc 11.

A segunda batelada de testes foi realizada com o uso de enzimas produzidas pelo cultivo da linhagem **BLBc 17**. As condições dos experimentos foram as mesmas dos primeiros ensaios, ou seja, da primeira batelada de testes. A análise visual das peles, realizada ao final da depilação, encontra-se na Figura 16.

Pela avaliação visual das peles, verifica-se a remoção parcial dos pelos em todos os testes, sendo que no teste 3, concentração de enzima maior e concentração de peróxido mais baixa, 300 U g^{-1} de pele e 4%, respectivamente, a remoção foi mais pronunciada. Porém, verificou-se que, também nestes ensaios, os pelos poderiam ser fisicamente removidos. Assim sendo, fez-se a remoção dos pelos mecanicamente, através de raspagem. A Figura 17 mostra como ficaram as peles após a remoção mecânica dos pelos.

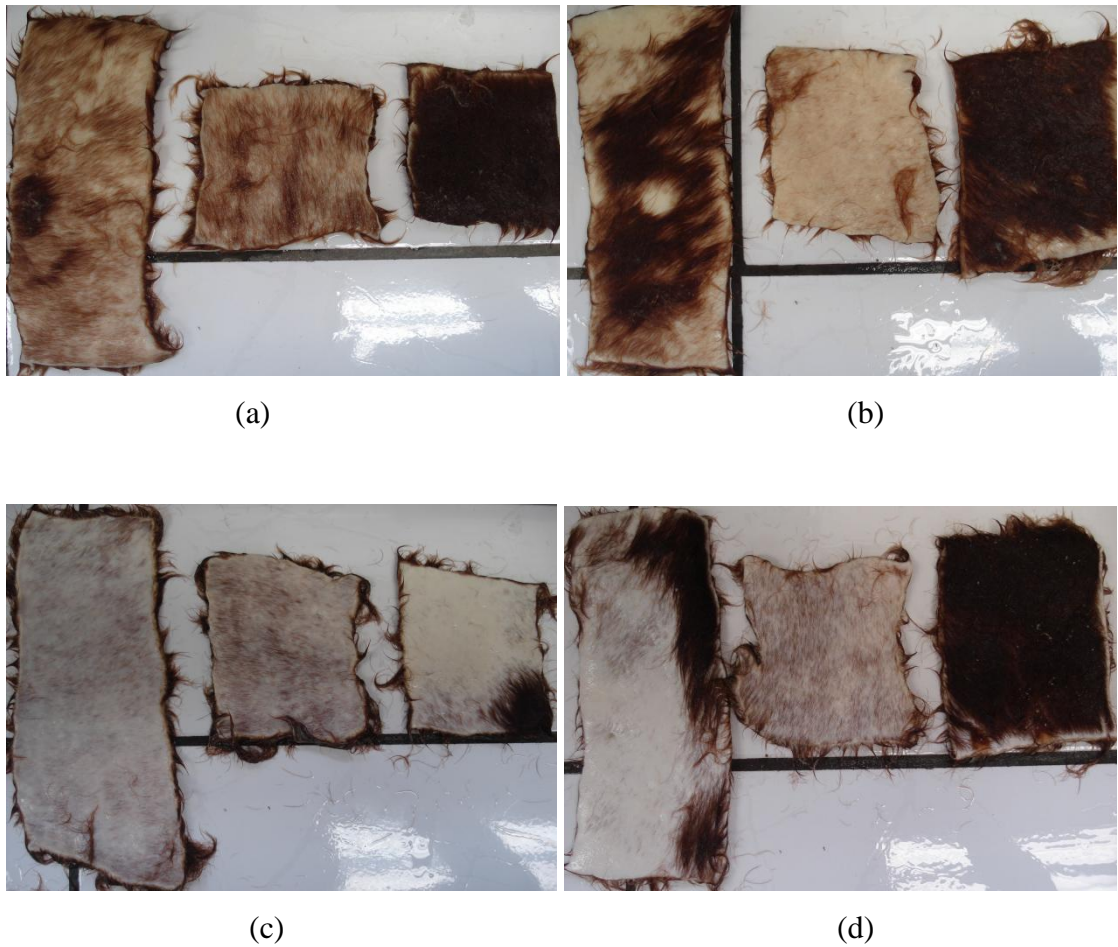


Figura 16: Análise visual das peles ao final dos testes, com uso de enzimas produzidas pela linhagem BLBc 17. (a) Teste 1: concentração de enzima 100 U g^{-1} de pele, e 4% de H_2O_2 ; (b) Teste 2: concentração de enzima 100 U g^{-1} de pele, e 8% de H_2O_2 ; (c) Teste 3: concentração de enzima 300 U g^{-1} de pele, e 4% de H_2O_2 ; (d) Teste 4: concentração de enzima 300 U g^{-1} de pele, e 8% de H_2O_2 .

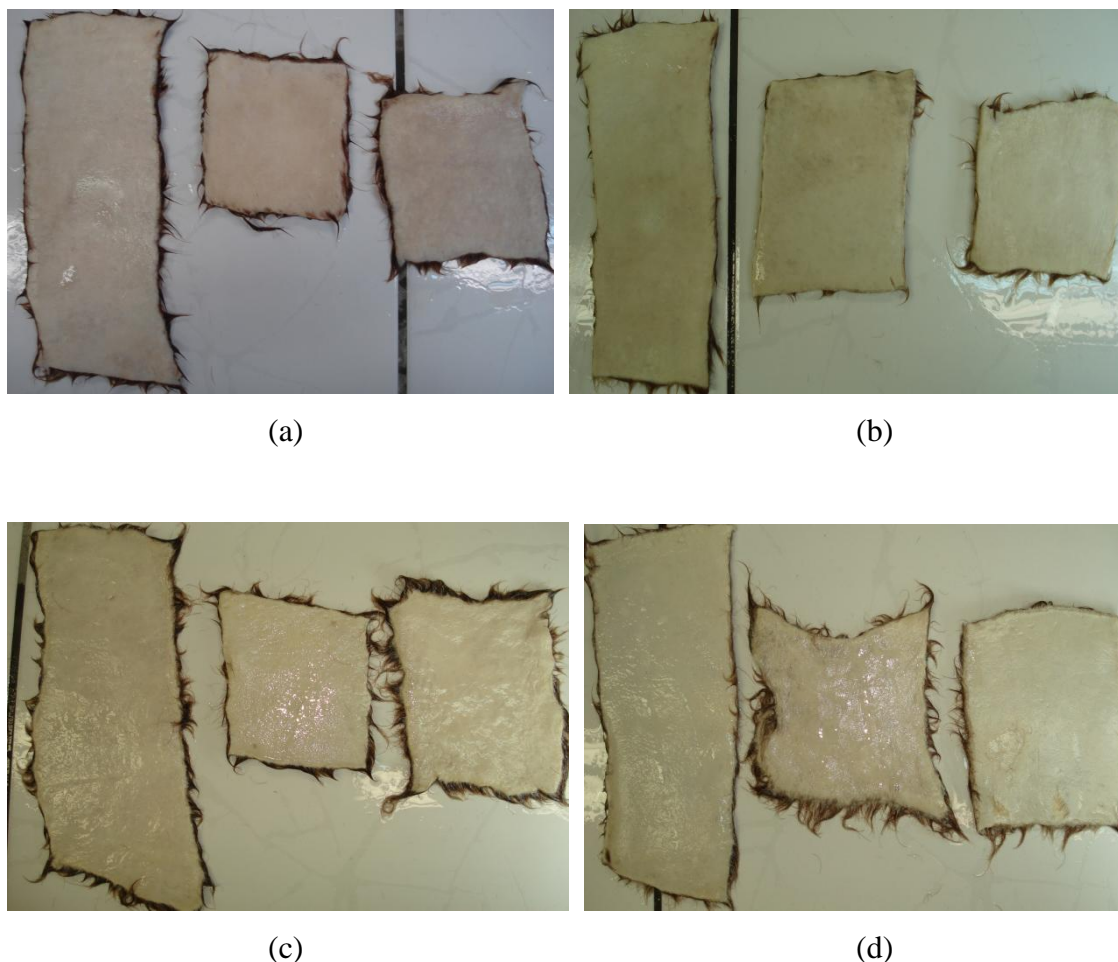


Figura 17: Análise visual das peles após remoção mecânica dos pelos. (a) Teste 1: concentração de enzima 100 U g^{-1} de pele, e 4% de H_2O_2 ; (b) Teste 2: concentração de enzima 100 U g^{-1} de pele, e 8% de H_2O_2 ; (c) Teste 3: concentração de enzima 300 U g^{-1} de pele, e 4% de H_2O_2 ; (d) Teste 4: concentração de enzima 300 U g^{-1} de pele, e 8% de H_2O_2 .

Pela avaliação visual das peles após remoção mecânica dos pelos, verifica-se que, os pelos foram facilmente removidos em todos os testes. Porém, nos testes 1 e 2, concentração baixa de enzima, observou-se a permanência de alguns pequenos pelos, que apresentaram dificuldade de remoção. Esses são, provavelmente, pelos “jovens”, que de acordo com Sousa (2006), apresentam junção mais forte com a derme, tornando assim mais difícil sua remoção por completo.

A Figura 18 mostra a ampliação das peles, após remoção física dos pelos. Verifica-se que os pelos nestes ensaios também foram removidos inteiramente, não deixando resíduos nos poros. A Figura 19 mostra os pelos removidos. Verifica-se que os pelos nestes ensaios também foram removidos inteiramente, ou seja, não foram rompidos por ataque químico.

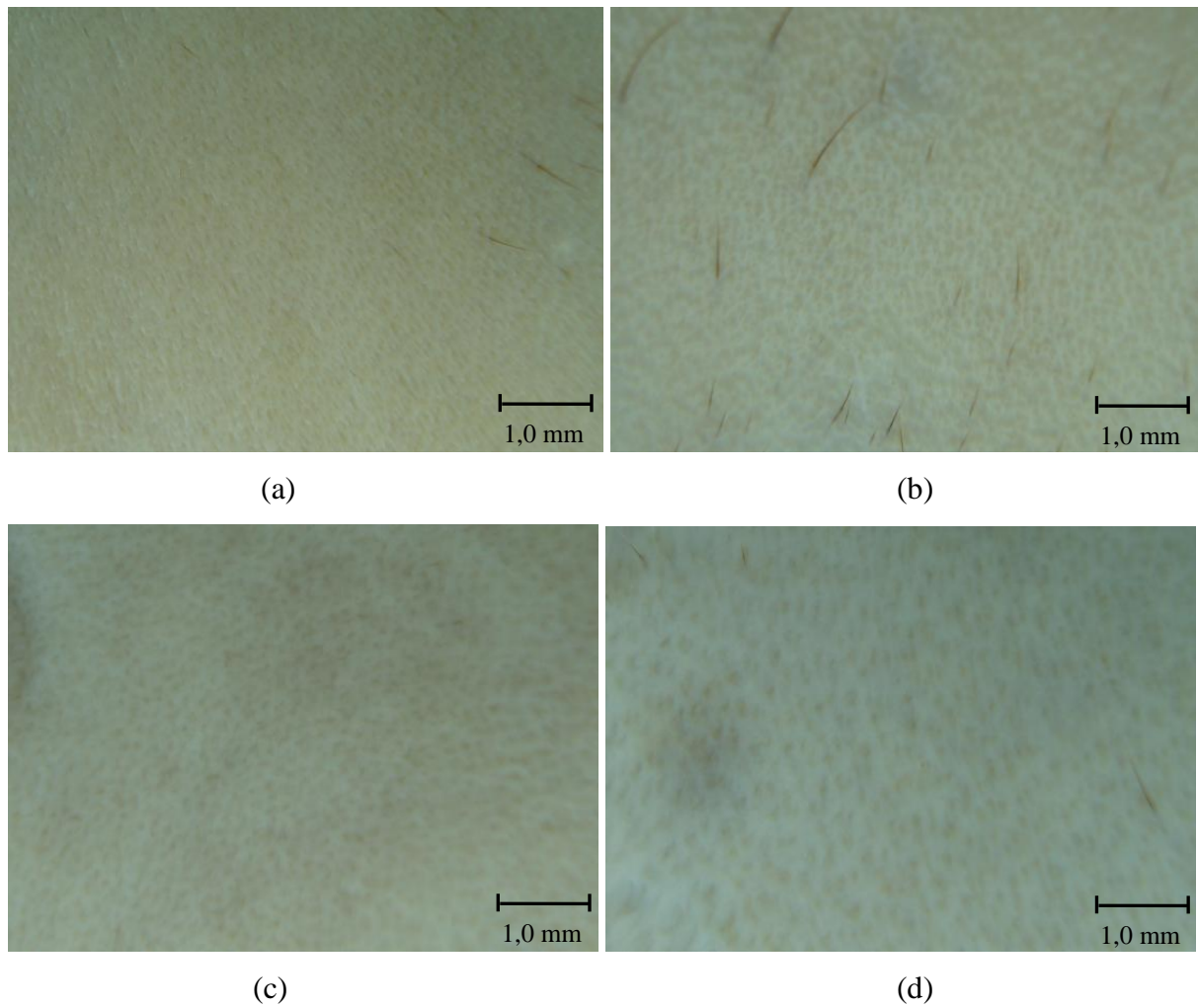


Figura 18: Ampliação das peles após remoção mecânica dos pelos (12 vezes). (a) Teste 1: concentração de enzima 100 U g^{-1} de pele, e 4% de H_2O_2 ; (b) Teste 2: concentração de enzima 100 U g^{-1} de pele, e 8% de H_2O_2 ; (c) Teste 3: concentração de enzima 300 U g^{-1} de pele, e 4% de H_2O_2 ; (d) Teste 4: concentração de enzima 300 U g^{-1} de pele, e 8% de H_2O_2 .



Figura 19: Pelos removidos inteiramente pelo processo de depilação enzimática-oxidativa.

Etapa enzimática: enzimas produzidas pela linhagem BLBc 17.

Com base nos resultados apresentados até este momento, verifica-se que, quanto a remoção dos pelos, a depilação foi parcial, tanto com o uso das enzimas produzidas pela BLBc 11 quanto com o uso das enzimas produzidas pela BLBc 17, na etapa enzimática. Porém, em ambos os processos os pelos apresentaram um grau de afrouxamento propício para a remoção física dos mesmos, o que se presume irá acontecer ao se trabalhar com maior quantidade de peles em escala maior.

Após a remoção física dos pelos, que foi realizada por raspagem, verificou-se que onde foram utilizadas as enzimas produzidas pela BLBc 17, a remoção de pelos e epiderme foi mais eficiente, mesmo que alguns pelos curtos (jovens) ainda estivessem presentes. Não verificou-se ataque à camada flor em nenhum dos experimentos enzimáticos-oxidativos.

Aparentemente, verifica-se a presença de pelos nas bordas das peles. Na verdade, estes pelos ficaram aderidos ao carnal das peles, o que não é problema, pois na etapa de divisão, esta camada, juntamente com os pelos aderidos, será removida.

Com relação à concentração de enzima, verificou-se que uma maior concentração favorece a depilação. Porém, com relação à concentração de peróxido de hidrogênio, o mesmo efeito não foi evidenciado na análise visual, visto que a concentração deste reagente não interferiu no processo. O uso de peróxido, neste caso, apenas acelerou o processo.

Comparando-se ao processo puramente enzimático, a adição do peróxido de hidrogênio à mesma concentração de enzimas (300 U g^{-1} de pele), forneceu resultados semelhantes, porém com redução do tempo de processo de 6 para 4 horas.

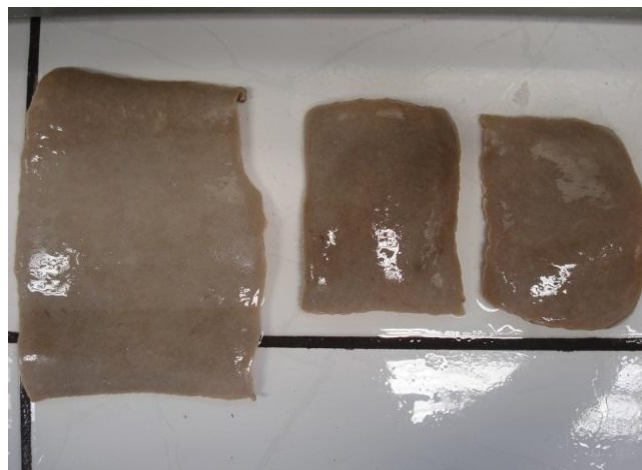
Em comparação com outros trabalhos da literatura, o processo enzimático-oxidativo proposto apresenta algumas vantagens em relação aos processos de depilação enzimáticos e oxidativos. Dettmer *et al.* (2012c) aplicaram enzimas produzidas pela linhagem de *Bacillus subtilis* BLBc 11 em peles bovinas em um processo de depilação de 6 horas, Sivasubramanian *et al.* (2008a) utilizaram enzimas produzidas por linhagens de *Bacillus subtilis* na depilação de peles de cabra, também em um processo de 6 horas. Souza e Gutterres utilizaram enzimas comerciais em um processo coenzimático de depilação de peles zebuínas, onde o tempo de processo foi de 16,4 horas. Marsal *et al.* (2002) estudaram a depilação oxidativa com peróxido de hidrogênio em um processo de 20 horas e Marsal *et al.* (1999) estudaram o uso de peróxido de hidrogênio e aminas em um processo de 14 horas, por exemplo. Enquanto que a depilação enzimática-oxidativa proposta foi realizada em torno de 4 horas.

Com relação à recuperação dos pelos, os resultados deste trabalho foram semelhantes aos resultados de trabalhos como os de Sivasubramanian *et al.* (2008a), Souza e Gutterres (2012) e Dettmer *et al.* (2012c), por exemplo, onde os pelos são removidos pela raiz, sem degradação, o que é de grande importância, pois estes podem ser utilizados para outros fins, além disso, a recuperação destes permite a obtenção de efluentes com menor carga orgânica.

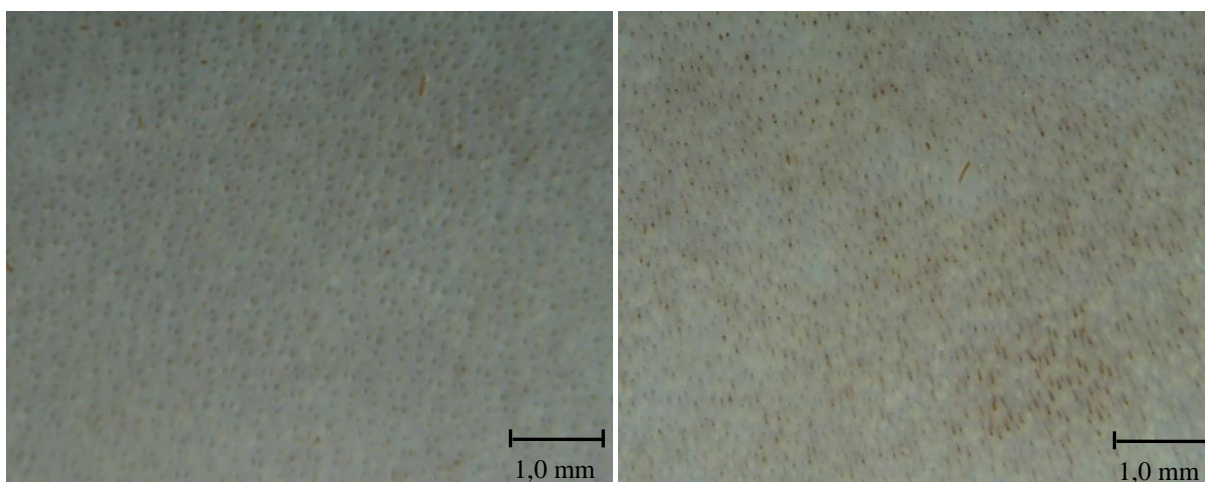
4.1.4 Depilação com cal e sulfeto de sódio

Para fins comparativos foi realizada a depilação com cal e sulfeto de sódio, que é comumente feita em curtumes. Neste ensaio foi utilizada a formulação descrita na Tabela 6, do capítulo 3.

Assim, como nos ensaios enzimáticos-oxidativos, as peles, primeiramente, foram avaliadas visualmente. Os resultados estão ilustrados nas imagens da Figura 20.



(a)



(b)

(c)

Figura 20: Análise visual das peles depiladas pelo sistema cal/sulfeto de sódio. (a) Peles ao final do processo; (b) e (c) Peles visualizadas com ampliação de 12 vezes.

A depilação com o uso de cal e sulfeto de sódio promove a remoção total do pelos, porém via degradação destes. Verifica-se, no entanto, que há regiões na pele em que a raiz do pelo não foi removida, permanecendo a mesma no interior do poro, como visualizado na imagem (c) da Figura 20.

Os poros ficaram mais abertos neste processo de depilação, quando comparado ao processo de depilação com enzimas e peróxido de hidrogênio. Porém, as peles depiladas com cal e sulfeto de sódio mostraram-se mais rígidas e inchadas do que as peles depiladas pelo método enzimático-oxidativo.

Uma das vantagens da depilação alternativa proposta neste trabalho, em relação o uso de cal-sulfeto, é a eliminação total de sulfeto de sódio neste processo, o que em termos ambientais e de segurança aos trabalhadores da indústria coureira, é bastante benéfica. Além

de haver a redução do tempo de processo, visto que a depilação enzimática-oxidativa é realizada em torno de 4 horas, ao passo que a depilação efetuada pelo sistema cal/sufeto de sódio dura de 15 a 18 horas. Outra grande vantagem da depilação enzimática-oxidativa frente ao processo convencional é a não destruição do pelo, que pode ser recuperado e utilizado para outros fins, como por exemplo, extração de queratina (WINTER *et al.*, 2011), que pode ser extraída pelo mesmos métodos utilizados para extrair queratina da lã (TANABE *et al.*, 2002)

No processo com o uso de cal e sulfeto de sódio faz-se necessária a realização da etapa de desencalagem, que objetiva a remoção de cal. Como no processo enzimático-oxidativo de depilação não se utiliza este reagente, esta etapa, a princípio, torna-se dispensável. Porém, como a alcalinidade dos banhos enzimáticos-oxidativos ainda é elevada, o estudo de uma etapa que promova a eliminação da alcalinidade presente nas peles, pode ser objeto para trabalhos posteriores.

4.1.5 Depilação enzimática

Um segundo teste comparativo foi realizado, fazendo uso somente do extrato enzimático produzido pelas linhagens de *Bacillus subtilis* BLBc 11 e BLBc 17, na concentração de 300 U g^{-1} de pele, por um período de 6 horas. Este tempo de processo foi baseado em trabalhos anteriores de Dettmer (2012) e Dettmer *et al.* (2012a, 2012b e 2012c), onde os autores aplicaram as enzimas produzidas pelas linhagens BLBc 11 e BLBc 17 na depilação de peles, obtendo resultados satisfatórios em um processo de 6 horas.

A Figura 21 mostra as peles ao final do processo com a enzima produzida pela linhagem BLBc 11. A imagem (a) mostra a pele após as 6 horas de depilação enzimática. Verifica-se que houve remoção parcial do pelos, porém estes apresentaram-se bastante afrouxados, com isso foi possível a remoção física do mesmos através de um processo de raspagem. A imagem (b) apresenta as peles após raspagem. As imagens (c) e (d) mostram peles com um aumento de 12 vezes, onde se pode verificar a abertura e limpeza dos poros.

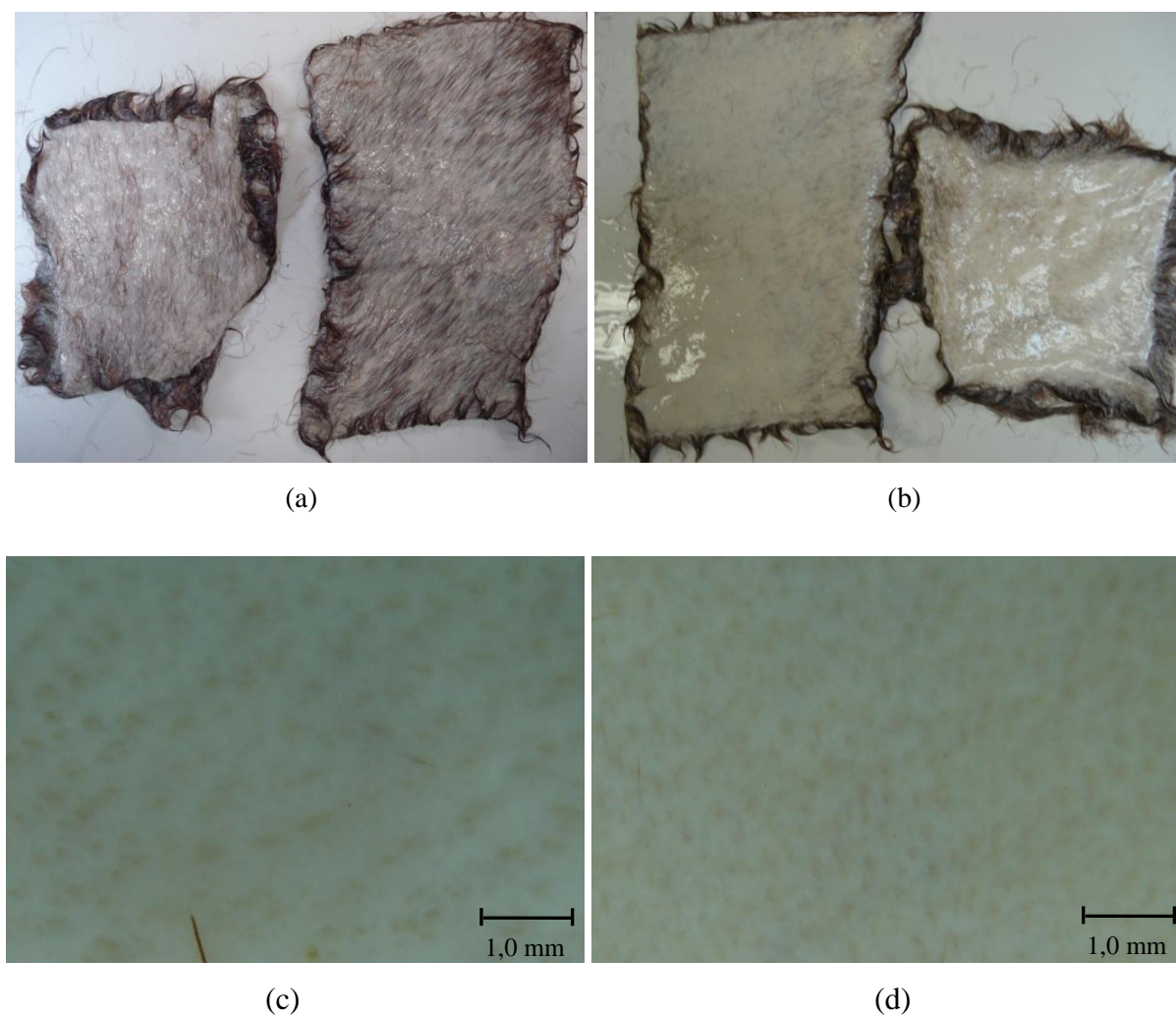


Figura 21: Depilação enzimática com enzimas produzidas pelo cultivo de BLBc 11. (a) Análise visual após a depilação; (b) Análise visual após remoção física dos pelos; (c) e (d) Peles depiladas com ampliação de 12 vezes.

O mesmo processo de depilação foi, também, realizado com o uso de enzimas produzidas pela linhagem BLBc 17. A Figura 22 apresenta os resultados da análise visual. Verifica-se que neste ensaio também houve remoção parcial dos pelos, porém devido ao afrouxamento destes, também foi possível a remoção mecânica dos mesmos. A imagem (b) mostra as peles após remoção mecânica dos pelos. As imagens (c) e (d) apresentam as peles com um aumento de 12 vezes, onde se pode verificar a eficiência de remoção dos pelos e a limpeza dos poros.

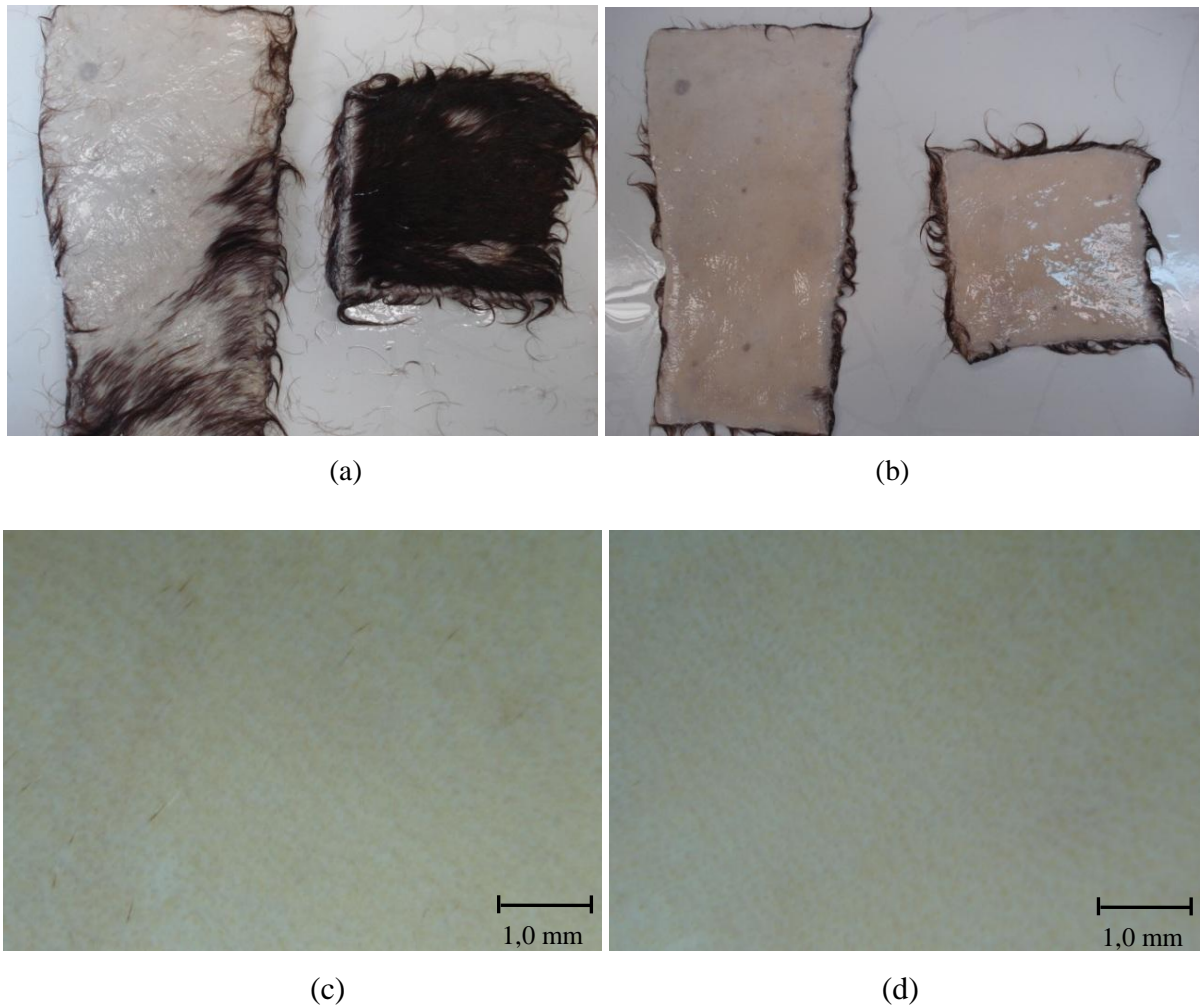


Figura 22: Análise visual da depilação enzimática com enzimas produzidas por BLBc 17. (a) Análise visual ao final da depilação; (b) Análise visual após remoção física dos pelos; (c) e (d) Avaliação com ampliação de 12 vezes.

A depilação somente enzimática com uso de enzimas produzidas pela linhagem BLBc 17 apresentou, visualmente, resultados melhores do que a depilação realizada com enzimas produzidas pela BLBc 11. As peles depiladas com enzimas produzidas pela linhagem BLBc 17 apresentaram aspecto semelhantes às peles depiladas com o uso de enzimas e peróxido de hidrogênio. Assim como nas depilações enzimáticas-oxidativas, não se verificou ataque à camada flor em nenhum dos experimentos de depilação enzimática.

Nas depilações enzimáticas, com ambos os extratos enzimáticos, o pelo não foi destruído, sendo neste aspecto, semelhante às respectivas depilações enzimáticas-oxidativas, porém o tempo de processo ainda foi superior a estes. Enquanto o processo enzimático dura

em torno de 6 horas, o método de depilação alternativo com uso de enzimas e peróxido de hidrogênio, é realizado em torno de 4 horas.

4.2 Resultados analíticos

Ao final dos ensaios de depilação os banhos foram coletados e realizaram-se análises de pH, sólidos dissolvidos totais (SDT), fixos (SDF) e voláteis (SDV), teor de nitrogênio total Kjeldahl (NTK), proteoglicanos e glicosaminoglicanos (proteínas interfibrilares), e determinação de hidroxiprolina. As análises de proteoglicanos, glicosaminoglicanos e hidroxiprolina foram realizadas em triplicata, e as análises de sólidos e nitrogênio total, em duplicata. Os resultados, em forma de tabela, encontram-se no Apêndice 1. A seguir, estes resultados serão apresentados na forma de gráficos, para melhor avaliação comparativa entre os métodos de depilação.

A Figura 23 é referente às análises de pH dos banhos residuais. O gráfico mostra que o valor de pH do banho residual da depilação realizada com uso de cal e sulfeto de sódio foi maior que os demais, atingindo um valor de 14,0. Os banhos dos ensaios enzimáticos-oxidativos apresentaram valores um pouco menores, em torno de 12,0. Já os processos puramente enzimáticos geraram banhos com valores de pH mais baixos, próximos a 8,0. Em relação à literatura, verifica-se que o processo enzimático-oxidativo apresentou pouca redução de pH quando comparado aos processos oxidativos, geralmente realizados em meios altamente alcalinos, onde o valores de pH se encontram em torno de 13,0 (SHI *et al.*, 2003, GEHRING *et al.*, 2003 e 2006) e 14,0 (MARMER *et al.*, 2003). Esta redução de pH verifica-se, também, quando o processo enzimático-oxidativo é comparado ao processo com cal e sulfeto de sódio.

Com relação ao pH dos banhos, pode-se dizer que a depilação puramente enzimática seria melhor opção. Porém, apesar do pH também alcalino dos banhos da depilação enzimática-oxidativa, estes banhos, ao contrário do banho do sistema cal/sulfeto, não contêm sulfetos nem cal, o que, em termos ambientais é bastante vantajoso.

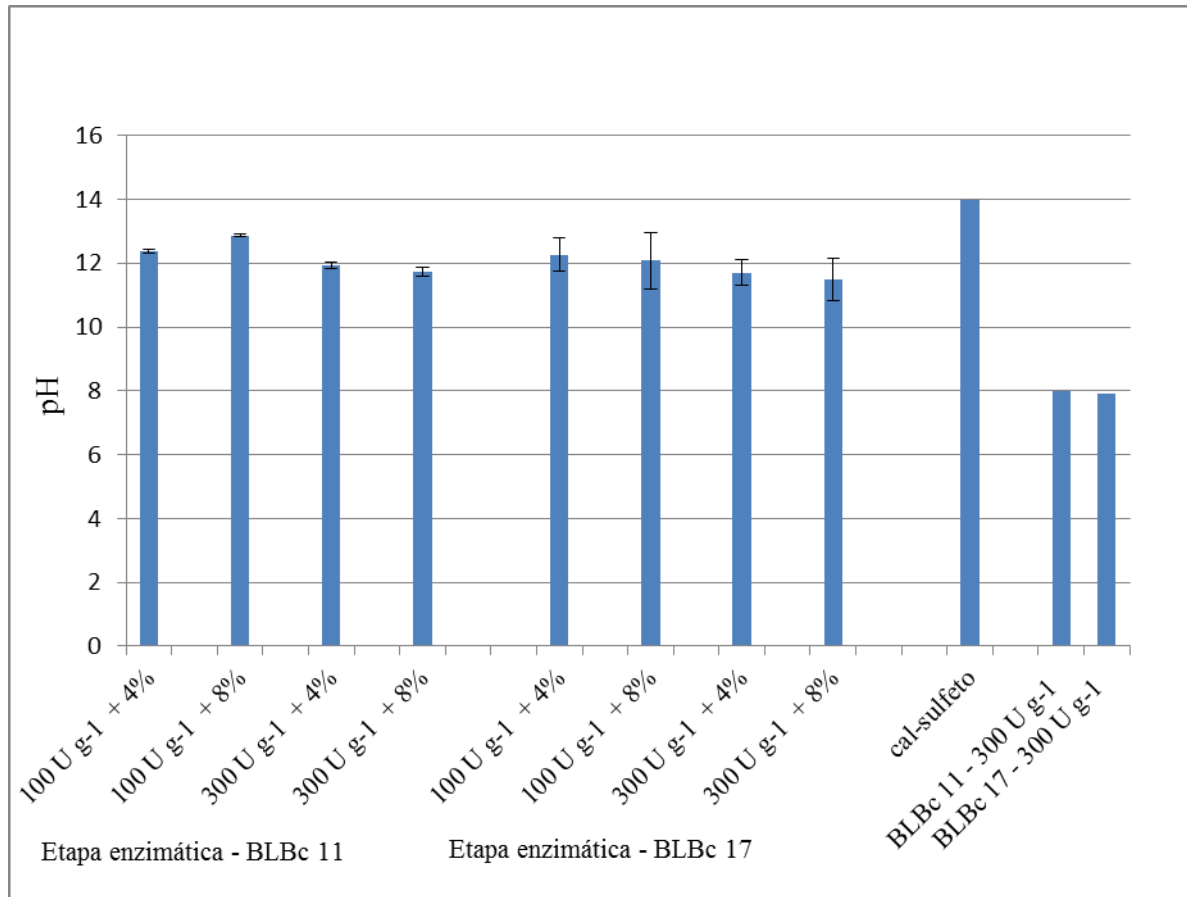


Figura 23: Gráfico comparativo da análise de pH nos banhos residuais dos ensaios de depilação.

A Figura 24 apresenta os resultados comparativos das análises de SDT, SDF e SDV. Verifica-se que para os ensaios de depilação enzimática-oxidativa, as maiores concentrações de sólidos totais nos banhos foram verificadas com uso de maior concentração de enzima na etapa enzimática, para ambas as enzimas. A concentração de sólidos totais nos banhos da depilação com cal e sulfeto de sódio apresentou valores um pouco inferiores. As menores concentrações de sólidos foram verificadas nos banhos das depilações enzimáticas-oxidativas realizados com menor concentração de enzima, principalmente com o uso da enzima produzida pela linhagem BLBc 11. Este mesmo comportamento é observado, também, para as análises de sólidos fixos e voláteis. Este resultado é contraditório aos resultados obtidos por Sivasubramanian *et al.* (2008a), Senthilvelan *et al.* (2012) e Sundar *et al.* (2006), que obtiveram menores concentrações de SDT em seus experimentos, em comparação ao processo convencional.

Os sólidos fixos representam o material inorgânico presente nos banhos. A concentração de sólidos voláteis nos banhos está relacionada com a presença de matéria

orgânica, como por exemplo, as gorduras e as proteínas. Percebe-se pela avaliação destes resultados que na remoção, tanto de matéria orgânica quanto de material inorgânico, a concentração de enzima é a principal influência. Com isso, pode-se dizer que a maior concentração de sólidos nos banhos da depilação enzimática-oxidativa, com maior concentração de enzimas, pode estar relacionada ao extrato enzimático, visto que o extrato enzimático, mesmo depois de centrifugado, pode ainda conter pequenas quantidades de sólidos provenientes dos componentes do meio de cultivo, o que pode ter interferido no teste, principalmente, nos testes realizados com maior concentração de enzima.

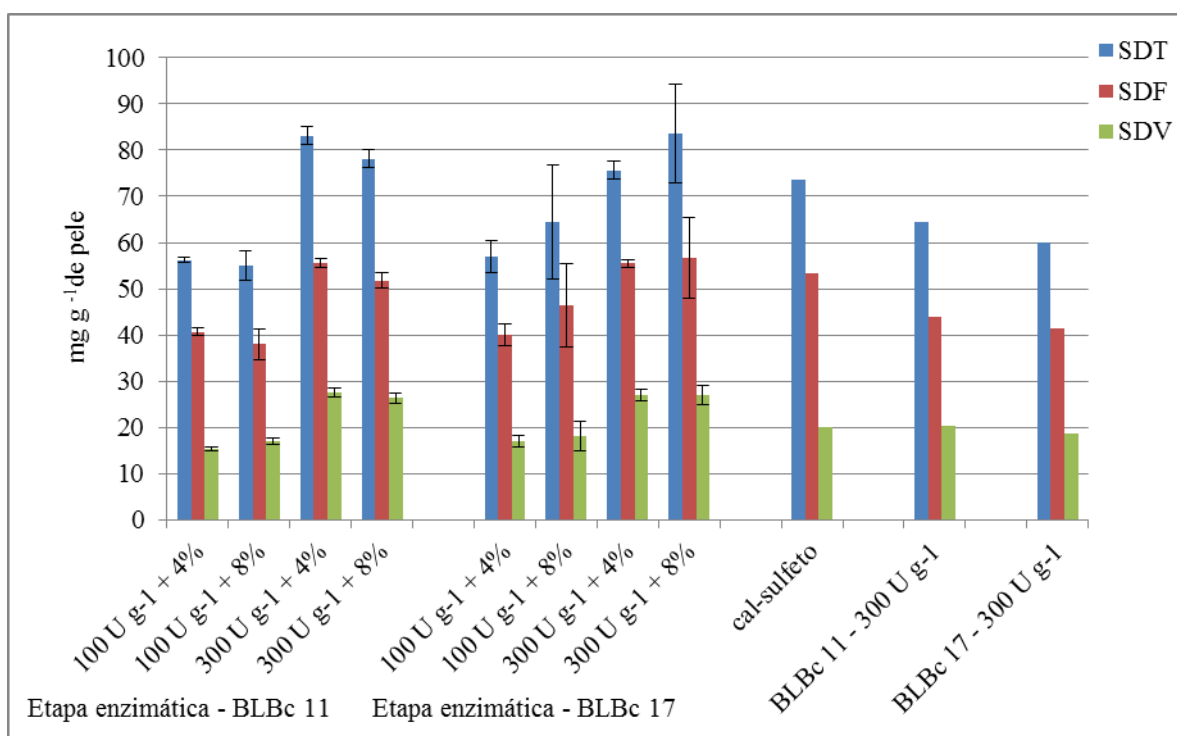


Figura 24: Resultados comparativos das análises de SDT, SDF e SDV nos banhos residuais dos ensaios de depilação.

Com relação às proteínas interfibrilares (proteoglicanos e glicosaminoglicanos), observa-se que a depilação com o uso de cal e sulfeto de sódio apresentou concentrações praticamente nulas destas proteínas neste banho, provavelmente devido à falta de ação mecânica. O sulfeto de sódio não possui a função de ataque a estas proteínas, sendo a ação mecânica, promovida pela ação do fulão e pelo impacto entre as peles durante o processo, e o inchamento, proporcionado pela cal, os fatores responsáveis pela eliminação destas proteínas da pele. Como os ensaios foram realizados em fulões de bancada, e com apenas três pedaços de pele, esta ação mecânica foi reduzida, quando comparada ao processo em escala industrial.

A maior remoção de proteínas interfibrilares foi verificada nos ensaios enzimáticos-oxidativos, onde a etapa enzimática foi efetuada com maior concentração de enzimas. A remoção destas proteínas nos ensaios onde foram utilizados extratos enzimáticos (depilação enzimática-oxidativa e puramente enzimática) é promovida não somente por ação mecânica, mas também pela ação das enzimas. De acordo com Jian *et al.* (2011), sacarídeos (glicosaminoglicanos) são degradados e liberados no banho, provavelmente, devido ao ataque ao centro protéico nos proteoglicanos pelas proteases. Após a degradação deste centro protéico, a integridade dos proteoglicanos é interrompida, e os sacarídeos (glicosaminoglicanos) nos proteoglicanos também são degradados e liberados no banho.

A Figura 25 apresenta os resultados comparativos das análises de glicosaminoglicanos e proteoglicanos.

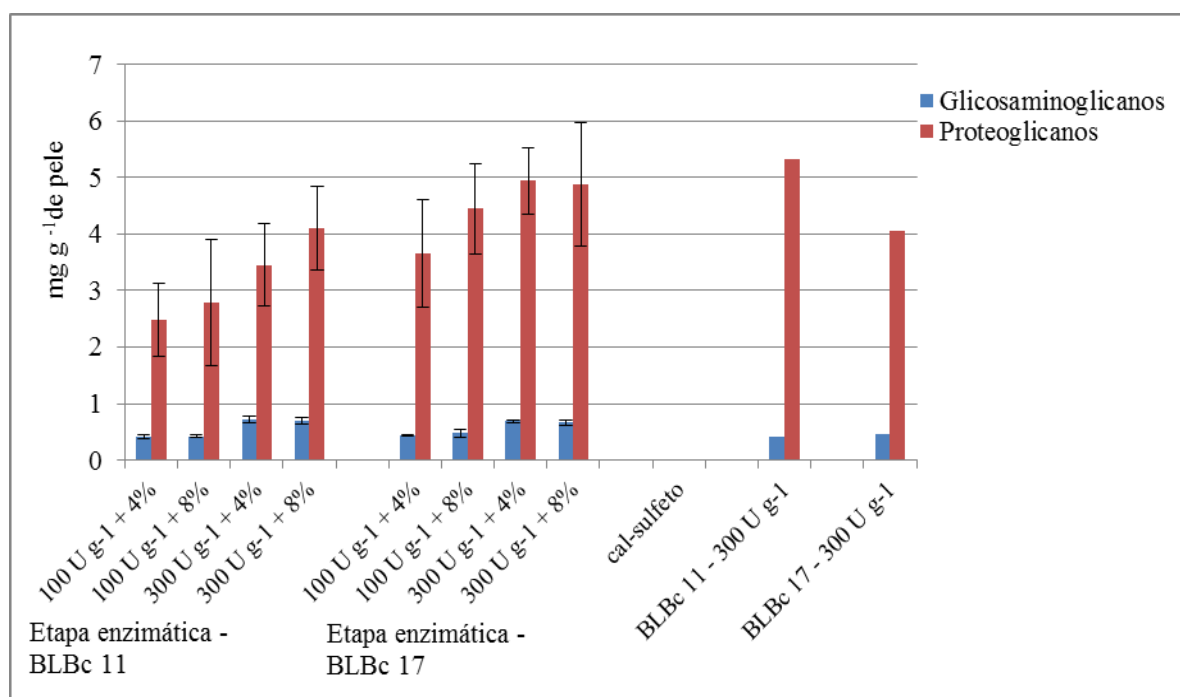


Figura 25: Resultados comparativos das análises de glicosaminoglicanos e proteoglicanos nos banhos residuais dos ensaios de depilação.

Com relação aos glicosaminoglicanos, o tipo de enzima e a concentração de peróxido não apresentaram influência significativa na remoção destes. Os ensaios de depilação puramente enzimática apresentaram nível de remoção de glicosaminoglicanos semelhante aos ensaios enzimático-oxidativos com menor concentração de enzimas na etapa enzimática.

Os ensaios enzimáticos-oxidativos apresentaram maior remoção de proteoglicanos nos testes onde foram utilizadas enzimas produzidas pela linhagem BLBc 17, sendo que para ambos os testes enzimáticos-oxidativos uma maior concentração de enzima favoreceu a remoção destas proteínas.

Percebe-se que na depilação somente enzimática, o uso do extrato enzimático produzido pela linhagem BLBc 11 apresentou maior remoção de proteoglicanos, porém quando associadas ao peróxido de hidrogênio, nos ensaios de depilação enzimática-oxidativa, o uso da enzima produzida pela BLBc 17, promoveu maior remoção desta proteína.

Com o uso do extrato enzimático produzido pela BLBc 11 na etapa enzimática do processo enzimático-oxidativo, verifica-se maior remoção de proteoglicanos nos testes realizados com maior concentração de enzima, sendo que no teste realizado na maior concentração de enzima e maior concentração de peróxido a remoção foi a maior. Já no caso do uso das enzimas produzidas pela BLBc 17 na etapa enzimática, a menor remoção foi verificada com uso da menor concentração de enzima e peróxido, as maiores remoções foram verificadas nos ensaios com maior concentração de enzima, independente da concentração de peróxido.

Tanto o uso de enzimas puras, quanto o uso associado de enzimas e peróxido de hidrogênio favorecem a remoção das proteínas interfibrilares.

Com relação à hidroxiprolina (Figura 26), na depilação com cal e sulfeto de sódio não foi detectada a presença deste aminoácido no banho, constatando que não houve ataque à estrutura do colágeno. Porém, nos demais ensaios, enzimáticos-oxidativos e puramente enzimáticos, verificou-se a presença de hidroxiprolina nos banhos, o que já era esperado, pois, de acordo com Dettmer *et al.* (2012a e 2012b), estas enzimas apresentam atividade sobre o *azocoll*, indicando a capacidade destas de atacarem o colágeno. As maiores concentrações foram detectadas nos banhos das depilações enzimáticas-oxidativas onde a etapa enzimática foi realizada com maior concentração de enzima.

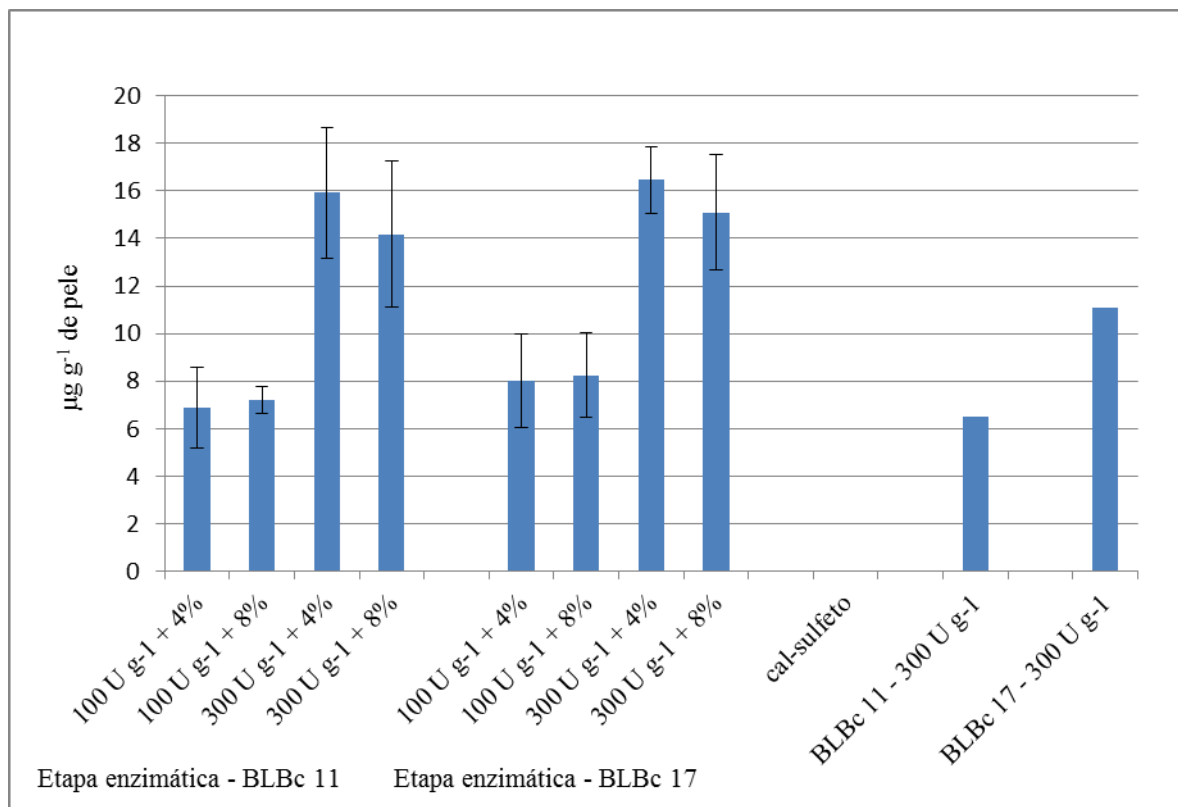


Figura 26: Resultados comparativos das análises de hidroxiprolina nos banhos residuais dos ensaios de depilação.

Nas depilações puramente enzimáticas, a concentração de hidroxiprolina no banho da depilação realizada com a enzima produzida pela BLBc 11 foi semelhante às concentrações presentes nos banhos enzimático-oxidativos com menor concentração de enzima. Com relação à depilação enzimática com a enzima produzida pela BLBc 17, a concentração de hidroxiprolina apresentou um resultado intermediário entre os processos enzimáticos-oxidativos com maior e menor concentração de enzima. Comparando apenas as depilações enzimáticas, verifica-se que a maior concentração de hidroxiprolina foi verificada no teste realizado com o uso das enzimas produzidas pela linhagem BLBc 17. De acordo com os resultados obtidos por Dettmer *et al.* (2012b), as enzimas produzidas pela BLBc 17 apresentam maior atividade sobre *o azocoll* ($135,70 \text{ U mL}^{-1}$), quando comparadas as enzimas produzidas pela linhagem BLBc 11 ($61,33 \text{ U mL}^{-1}$), o que indica maior ataque ao colagênio, e conseqüentemente, maior remoção de hidroxiprolina.

Porém, a concentração desta substância nos banhos foi muito baixa, podendo-se, então, considerar que houve um leve ataque à estrutura do colagênio. Observa-se que estes resultados apresentam a concentração em $\mu\text{g g}^{-1}$ de pele, ou seja, uma ordem de grandeza

menor do que os resultados das demais análises, o que ratifica a consideração de um leve ataque à estrutura do colagênio.

Com relação ao nitrogênio (Figura 27), percebe-se que a maior concentração foi observada no banho da depilação com cal e sulfeto de sódio. O teste 4 (maiores concentrações de enzimas e peróxido de hidrogênio) do processo enzimático-oxidativo, com uso de enzimas produzidas pela linhagem BLBc 17 na etapa enzimática, e os banhos das depilações puramente enzimáticas, apresentaram concentração de nitrogênio um pouco menor do que o banho do método convencional. Os demais os ensaios de depilação enzimática-oxidativa apresentaram remoção menor de nitrogênio quando comparados ao sistema cal-sulfeto e às depilações puramente enzimáticas. Estes resultados se assemelham aos dados da literatura, onde autores que estudaram processos oxidativos (MORERA *et al.*, 2006) e enzimáticos (VALEIKA *et al.*, 2009), obtiveram redução da concentração de nitrogênio total nos banhos, quando comparados ao processo convencional de depilação.

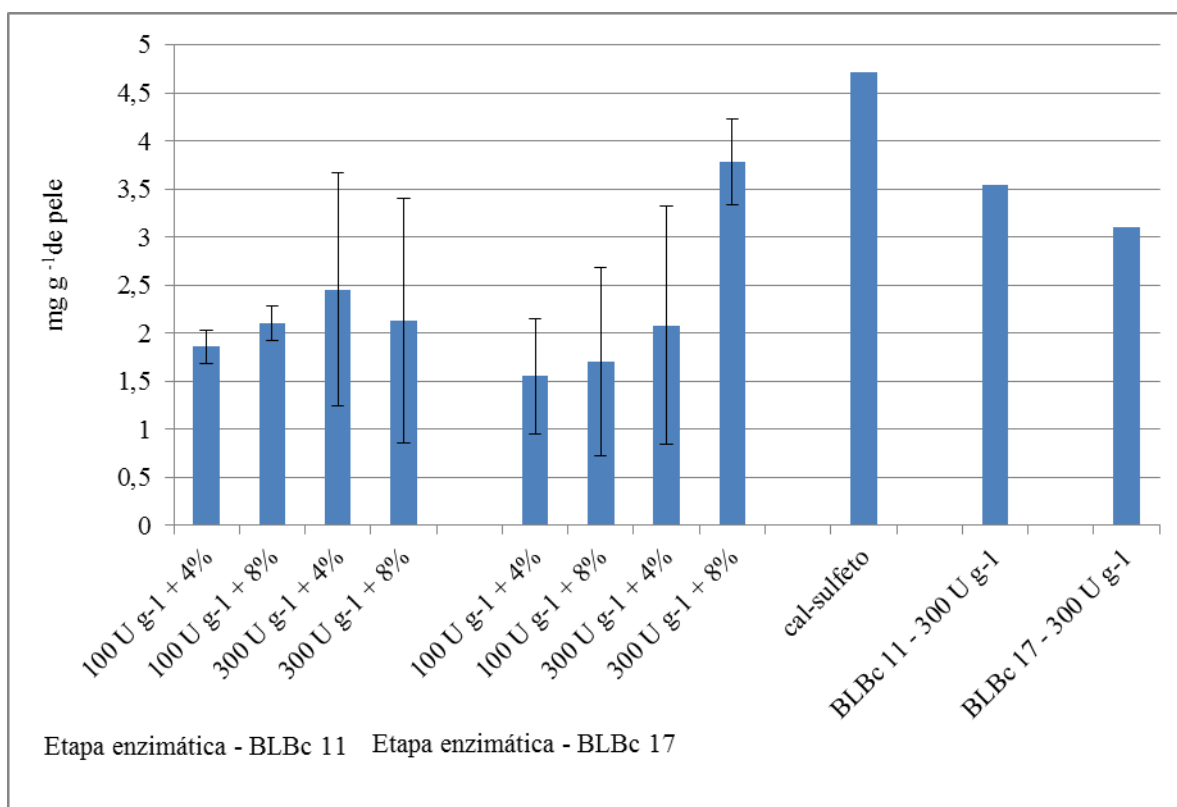


Figura 27: Resultados comparativos das análises de nitrogênio total (NTK) nos banhos residuais dos ensaios de depilação.

A maior concentração de nitrogênio presente no banho da depilação com cal e sulfeto de sódio deve-se, principalmente, ao fato de que os pelos, neste processo, são degradados, aumentando assim a carga orgânica do banho. Baur (2012) analisou a quantidade de nitrogênio presente nos pelos, obtendo um valor de 5,37% (base seca). Isto indica que a degradação dos pelos, ou seja, da queratina presente nos pelos, favorece o aumento da concentração de nitrogênio nos banhos residuais. Ao passo que a presença de nitrogênio nos banhos dos demais testes está relacionada, principalmente, à remoção das proteínas interfibrilares, além de outras proteínas e gorduras, que são atacadas pelas enzimas proteolíticas usadas nos ensaios. Nos ensaios realizados com enzimas, o teor de nitrogênio nos banhos, também pode estar relacionado à presença de material orgânico no extrato enzimático utilizado, pois o extrato enzimático, mesmo depois de centrifugado, pode conter traços dos reagentes utilizados na composição do meio de cultivo. No entanto, mesmo assim, a presença de nitrogênio nos ensaios enzimáticos e enzimáticos-oxidativos foi menor do que no ensaio realizado com cal e sulfeto de sódio, mostrando que estes métodos de depilação são capazes de promover a redução de nitrogênio nos efluentes.

Verificou-se que a concentração de peróxido de hidrogênio não apresentou influência significativa em nenhuma das análises realizadas. Porém, a sua presença no processo enzimático-oxidativo favoreceu a redução do tempo de processo, tanto em comparação ao método convencional, quanto em comparação ao método de depilação puramente enzimático.

Com relação à qualidade do couro, neste trabalho não foram realizados testes mecânicos (resistência, tensão de ruptura, etc.), porém acredita-se que não haja diferenças significativas na qualidade do couro produzido tanto pelo processo com cal e sulfeto de sódio quanto pelos processos enzimáticos e enzimáticos-oxidativos, visto que vários autores realizaram estes testes e não verificaram alterações expressivas nos resultados dos testes de resistência. Dettmer *et al.* (2012c) realizaram um comparativo entre o processo de depilação enzimática, usando a bactéria BLBc 11, frente ao convencional, utilizando sulfetos, onde foram avaliadas a resistência mecânica e a estabilidade hidrotérmica das peles obtidas pelos dois processos. Os autores não observaram diferenças significativas com relação ao teor de cromo e à temperatura de retração. Também não foram observadas perdas na resistência do couro obtido pela depilação enzimática.

4.3 Limitações do trabalho

A investigação científica realizada nesta dissertação de mestrado apresenta algumas limitações, as quais podem ter influenciado alguns resultados. São elas:

- **Pele utilizada:** Nos testes realizados foram utilizadas amostras retiradas de uma só pele, não sendo portanto verificada a variabilidade de peles diferentes. Estas amostras foram retiradas da zona chamada grupão, região central da pele com características mais uniformes, proveniente de um único animal. Entretanto, sabe-se que, por se tratar de um material natural, mesmo na região do grupão há variações de composição, não sendo possível eliminar esta variabilidade.
- **Escala de trabalho:** Os testes foram realizados em uma bateria de fulões em escala de bancada, não sendo realizados testes em escala piloto ou industrial.
- **Resultados analíticos:** Nas análises de proteoglicanos, glicosaminoglicanos e proteoglicanos, são utilizadas quantidades de amostra na ordem de μL , ou seja, pequena quantidade de amostra analisada, e a limitação das técnicas de análise, visto que a análise da pele foi realizada em baixo aumento (sem MEV).
- **Enzimas e agente oxidante:** os testes foram realizados com enzimas produzidas pelo cultivo de apenas duas linhagens de *Bacillus subtilis*, BLBc 11 e BLBc 17, já isoladas e selecionadas em trabalhos anteriores (Dettmer, 2012), e utilizou-se apenas um tipo de agente oxidante, o peróxido de hidrogênio, utilizado por ser um dos mais versáteis e mais estudados.

Capítulo 5

Conclusões

A seguir serão apresentadas as conclusões deste trabalho e as sugestões para trabalhos futuros.

5.1 Conclusões

Após a avaliação dos resultados apresentados e discutidos no capítulo anterior, chegaram-se as seguintes conclusões:

- O processo de depilação enzimática-oxidativa proposto neste trabalho mostrou-se uma alternativa viável ao processo de depilação com uso de cal e sulfeto de sódio, comumente utilizado nos curtumes.
- O uso associado de enzimas e peróxido de hidrogênio, embora não tenha removido totalmente os pelos, promoveu o afrouxamento destes, facilitando, assim, sua remoção mecânica. Sendo que os pelos removidos, tanto durante o processo de depilação quanto fisicamente, estavam inteiros, ou seja, não foram degradados. Os pelos assim recuperados podem ser utilizados para outros fins (extração de queratina, fertilizante do solo, produção de feltros, etc.). Além disso, a não degradação dos pelos gera efluentes com menos carga orgânica, ou seja, mais facilmente tratados.
- Outra vantagem do processo enzimático-oxidativo, é a depilação mais rápida. A depilação puramente enzimática também reduz o tempo de processo, porém quando se associa o peróxido de hidrogênio às enzimas, este produto oxidante atua mais rapidamente, acarretando, portanto, a redução do tempo de processo. A

redução no tempo de processo é uma vantagem econômica, visto que enquanto a depilação convencional dura de 15 a 18 horas, o processo proposto neste trabalho durou apenas 4 horas.

- Os efluentes gerados, tanto pelo processo puramente enzimático quanto pelo processo enzimático-oxidativo proposto neste trabalho produzem efluentes menos agressivos. As enzimas utilizadas são biodegradáveis e o peróxido de hidrogênio durante os processos degrada-se, transformando-se em água. O sulfeto de sódio, por sua vez, pode acarretar sérios acidentes, pois em contato com soluções ou reagentes ácidos há formação de gás sulfídrico (H_2S), que pode causar intoxicação e até a morte.
- Dentre as enzimas testadas em associação com o peróxido de hidrogênio, as proteases produzidas pela linhagem BLBc 17 apresentaram os melhores resultados, tanto na análise visual, quanto na remoção de proteínas interfibrilares. Lembrando que a remoção destas proteínas é importante para a abertura das fibras, garante-se assim a penetração eficiente dos produtos químicos aplicados nas etapas posteriores à depilação.
- O uso de enzimas produzidas pela linhagem BLBc 11 também apresentou bons resultados quando associadas ao peróxido de hidrogênio.
- O uso de uma maior concentração de enzimas favorece o processo de depilação. Porém, o mesmo não ocorreu com o peróxido de hidrogênio, que proporcionou o mesmo efeito nas duas concentrações testadas.
- O uso de peróxido de hidrogênio favoreceu o processo de depilação, acelerando o processo, reduzindo assim o tempo do procedimento.
- O processo enzimático-oxidativo, assim como o processo puramente enzimático de depilação, requer um controle cuidadoso, pois uma concentração muito alta de enzima ou peróxido, bem como um elevado tempo de processo, pode acarretar em danos à camada flor, que deve permanecer intacta ao final do processo, além de poder promover um ataque forte ao colagênio, o que deve ser evitado.
- Mesmo que nos testes de depilação enzimáticos-oxidativos tenha sido verificada a presença de hidroxiprolina nos banhos, os valores desses resultados são muito baixos, visto que sua concentração é medida em $\mu g g^{-1}$ de pele, enquanto os outros resultados (proteoglicanos, glicosaminoglicanos, SDT, SDF, SDV e nitrogênio

total), estão em mg g^{-1} de pele. Assim, pode-se considerar que o ataque à estrutura do colagênio foi relativamente leve.

- A elevada concentração de nitrogênio no banho da depilação com cal e sulfeto de sódio, deve-se ao fato de que neste tipo de processo a queratina do pelo é diretamente atacada pelo sulfeto de sódio, acarretando na sua degradação, ocasionando, assim, um aumento no teor de nitrogênio presente no banho residual.
- Com relação aos equipamentos, tinha-se a preocupação de que o uso de peróxido de hidrogênio pudesse danificar os fulões, porém não se verificou danos ao material destes.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

- Fazer testes em outras faixas de concentração de enzimas e peróxido de hidrogênio, visto que neste trabalho foram utilizadas apenas duas concentrações diferentes de enzimas e peróxido de hidrogênio.
- Testar tempos de processo diferentes.
- Pode-se fazer a etapa enzimática e recolher o banho para ser reutilizado, visto que nos trabalhos de Dettmer (2012), não foi verificada a perda elevada da atividade enzimática destas enzimas ao final do processo de depilação. Fazendo, então, a etapa oxidativa em um novo banho pode-se, também, fazer testes de reuso com este banho, composto apenas de água, hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio.
- Testar outros produtos oxidantes, como o dióxido de cloro, peróxido de cálcio, etc, em associação com as enzimas.
- Verificar se há necessidade de desencalagem, ou melhor, de algum método de remoção da alcalinidade, proporcionada à pele pelo uso de hidróxido de sódio, e em que grau.
- Testar outras etapas de processo até o curtimento e conferir a qualidade do couro obtido. Salientando-se que a qualidade do couro obtido a partir da depilação puramente enzimática, com uso das mesmas enzimas utilizadas neste trabalho, já foi verificada, e os couros apresentaram características semelhantes ao couro produzido a partir da depilação convencional com cal e sulfeto de sódio.
- Avaliar o efluente, também, através de análises de DBO e DQO. Sendo que estas análises já foram realizadas nos banhos obtidos em trabalhos anteriores, onde as

mesmas enzimas testadas neste trabalho foram utilizadas em um processo de depilação puramente enzimático, verificando-se a redução destes dois parâmetros nos banhos residuais, em comparação ao processo convencional com cal e sulfeto de sódio.

- Realizar análises em MEV.
- Estudar métodos de avaliação da remoção de pelos e da área depilada.
- Estudar algum método para verificar a área ou diâmetro do poro.

Referências bibliográficas

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

ANDERS, F.; WOLFGANG, H.; ZWICKAU, W. H. (FH); BERNHARD, Z.T.; FB Textilund Ledertechnik; Forschungsinstitut für Leder und Kunststoffbahnen gGmbH. Oxidative Enthaarung noch aktuell? 3° Freiberg Collagen Symposium. 2004.

AQUIM, P. M. Balanço de Massa: uma ferramenta para otimizar os processos de ribeira e curtimento. 181p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

AQUIM, P. M. Gestão em curtumes: uso integrado e eficiente da água. 146p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

AQUIM, P. M.; MANCOPE, F.; GUTTERRES, M. Emprego de enzimas como processo alternativo de ribeira na produção de couro, XVII Congresso de Engenharia Química, Recife – Brasil, 2008.

ASTM. Standart test method for nitrogen content (Kjeldahl) and hide substance content of leather. D2668: 3p. 2007.

BAREIL, R. P.; GAUVIN, R.; CLICHE, S.; GARIÉPY, C.; GERMAIN, L.; BERTHOD, F. Comparative study of bovine, porcine and avian collagens for the production of tissue engineered dermis. *Acta Biomaterialia*, 7, 3757- 3765, 2011.

BASF. Vade-mécum do Curtidor. 4º edição, revisada e ampliada, 2004.

BAUR, L. Estudo e identificação de nitrogênio em efluentes de curtume. 132p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

BIENKIEWICZ, K. Physical Chemistry of Leather making. Florida, 1983. p.67-78.

BRONCO, S.; CATIELLO, D.; D'ELIA, G.; SALVADOR, M.; SEGGIANI, M.; VETOLO, S. Oxidative unhairing with hydrogen peroxide: Development of an industrial scale process for high quality upper leather. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 100, 45 – 53, 2005.

BROWN, E. M. Collagen – A natural scaffold for biology and engineering. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 104, 275 – 285, 2009.

CASTIELLO, D.; PUCCINI, M.; SEGGIANI, M.; VITOLO, S.; ZAMMONI, F. Life cycle assessment (LCA) of the oxidative hydrogen peroxide. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 103, 1 – 6, 2008.

CETESB. Disponível na internet: <http://www.cetesb.sp.gov.br/gerenciamento-de-riscos/emergencias-quimicas/31-oxidantes-e-perioxido-organicos>. Acesso em 30/05/2012.

CRISPIM, A. and MOTA, M. Unhairing with enzymes. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 87, 198 – 202, 2003.

DETTMER, A. Seleção, isolamento e otimização dos meios de cultivo de microrganismos produtores de enzimas para aplicação ao processamento de peles na etapa de depilação/caleiro. 115 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

DETTMER, A.; AYUB, M.A.Z.; GUTTERRES, M. Hide unhairing and characterization of comercial enzymes used in leather manufacture. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. Vol. 29, n.3, 373-380, 2011.

DETTMER, A.; CAVALLEIRO, J. C.; CAVALLI, E.; ROSSI, D. M.; GUSATTI, C. S.; AYUB, M. A. Z.; GUTTERRES, M. Optimization of the biotechnological process for hide unhairing in substitution of toxic sulfides. *Chemical Engineering Technology*, 35, n.5, 803 – 810, 2012a.

DETTMER, A.; CAVALLI, E.; AYUB, M. A. Z.; M. GUTTERRES, M. Optimization of the unhairing leather processing with enzymes and the evaluation of inter-fibrillary proteins removal and environment-friendly alternative. *Bioprocess Biosyst Eng*, Vol.35, 1317-1324, 2012b.

DETTMER, A.; CAVALLI, E.; AYUB, M. A. Z.; GUTTERRES, M. Environmentally friendly hide unhairing enzymatic hide processing for the replacement of sodium sulfide and delimiting. *Journal of cleaner production*. Available online: 09/05/12, 2012c.

FUCK, W. F. Influência do teor de cromo e do tipo de óleo na formação de cromo hexavalente no couro. 88p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

g1. globo.com. Disponível na internet:

<http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2012/02/acidente-provoca-morte-de-quatro-funcionarios-da-marfrig-em-mt.html>;

<http://g1.globo.com/mato-grosso-do-sul/noticia/2012/01/reacao-com-acido-provocou-mortes-em-curtume-diz-corpo-de-bombeiros.html>

Acesso em 22/08/12.

GALARZA, B. C.; CAVELLO, I.; GRECO, C. A.; HOURS, R.; SHULDT, M. M. Alternative Technologies for adding value to bovine hair waste. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 94, 26 – 32, 2009.

GEHRING, A. G.; BAILEY, D. G.; DIMAIO, G. L.; DUDLEY, R. L.; MARMER, W. N.; MAZENKO, C. E. Rapid oxidative unhairing with alkaline calcium peroxide. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 98, 216 – 223, 2003.

GEHRING, A. G.; DUDLEY, R. L.; MAZENKO, C. E.; MARMER, W. N. Rapid oxidative dehairing with magnesium peroxide and potassium peroxydisulfate. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 101, 324 – 329, 2006.

GOINGO, J. L.; LUCAS, F. S.; CASARIN, F.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. *World J. Microbial Biotechnol*, 23, 375 – 382, 2007.

GUIA BRASILEIRO DO COURO – ABQTIC, 2012

GUPTA, R., BEG, Q.K., LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbial Biotechnol*, 59, 15 – 32, 2002.

GUTTERRES, M. Apostila Tecnologia do Couro I e II, 2010 (graduação), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

GUTTERRES, M. Estrutura de Colagênio da Pele. *Revista do Couro*, ed 170, p. 76-80, 2004.

GUTTERRES, M. Tendencias Emergentes en la Industria Del Cuero. Boletín Técnico de la Asociación Química Española de la Industria de Cuero, Barcelona, 57, n.1, p. 22-27, 2006.

HEIDEMANN, E. Fundamentals of Leather Manufacturing, Darmstadt: Eduard Roether KG, 1993. p. 49-193.

HERMANN, L. Enzimas no processo de industrialização do couro. *Revista do Couro*, ed. 186, 92 – 94, 2006.

HOFMAN, K.; HALL, B.; CLEAVER, H.; MARSHALL, S. High-throughput quantification of hydroxyproline for determination of collagen. *Analytical Biochemistry*, 417, 289-291, 2011.

HOINACKI, E.; MOREIRA, M. V.; KIEFER, C. G. Manual Básico de Processamento do Couro. SENAI/RS, 1994.

JIAN, S., WENYI, T., WUYONG, C. Kinetics of enzymatic unhairing by protease in leather industry. *Journal of Cleaner Production*, 19, 325 – 331, 2011.

JOHN, G. Posibles fallas em el cuero y en su production – conceptos, causas, consecuencias, remédios y tipos de cueros. Lampertheim/Alemanha, 1998. p. 36-49.

LI, S., LI, J., YI, J., SHAN, Z. Cleaner beam house processes trial on cattle sofa leather. *Journal of Cleaner Production*, 18, 471 – 477, 2010.

LIU, D.; LIANG, L.; REGENSTEIN, J. M.; ZHOU, P. Extraction and characterisation of pepsin – solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chemistry*, 133, 1441 – 1448, 2012.

MADHAN, B.; RAO, J. R.; NAIR, B. U. Studies on the removal of interfibrillary materials part I: removal of protein, proteoglycan, glycosaminoglycans from conventional beamhouse process. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 105, 145 – 149, 2010.

MANCOPE, F.; GUTTERRES, M.; DETTMER, A.; BARRIONUEVO, P. Colagênio: estrutura, propriedades e processos. XVII Congresso Latino Americano dos Químicos e Técnicos da Indústria do Couro, Rio de Janeiro – Brasil, 2008.

MARMER, W. N. and DUDLEY, R. L. Rapid oxidative dehairing using alkaline hydrogen peroxide and potassium cyanate: reuse of the unhairing reagentes. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 100, 165 – 173, 2005.

MARMER, W. N.; DUDLEY, R. L.; GEHRING, A. G. Rapid oxidative unhairing with alkaline hydrogen peroxide. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 98, 351 – 358, 2003.

MARMER, W.N. e DUDLEY, R.L. Depilação oxidante com percarbonato de sódio. *Revista do Couro*, ed. 196, 68 – 74, 2008.

MARSAL, A.; COT, J.; BARTOLI, E.; BOSH, T.; MANICH, A. Oxidising unhairing process with hair recovery. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 86, 30 – 33, 2002.

MARSAL, A.; MORERA, J. M.; BARTOLÍ, E.; BORRÁS, M. D. Study on unhairing process with hydrogen peroxide and amines. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 94, 1 – 10, 1999.

MATTOS, I. L.; SHIRAIISHI, K. A.; BRAZ, A. D.; FERNANDES, J. R. Peróxido de Hidrogênio: importância e determinação. *Química Nova*, 26, No. 3, 373-380, 2003.

MORERA, J.; BACARDIT, A.; OLLÉ, L.; BARTOLÍ, E.; BORRÁS, M. D. Minimization of the environmental impact in the unhairing bovine hides. *Chemosphere*, 72, 1681 – 1686, 2008.

MORERA, J.M.; BARTOLÍ, E.; BORRÁS, M. D.; BANASZAK, S. Oxidative unhairing of leathers: influence of several process parameters and environmental improvements. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 101, 347 – 354, 2006.

NAZER, D. W.; AL-SA'ED, R. M.; SIEBEL, M. A. Reducing the environmental impact of the unhairing – liming process in the leather tanning industry. *Cleaner Production*, 14, 65 – 74, 2006.

NETO, J. A. Algumas aplicações de enzimas. IN: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial - Processos Fermentativos e Enzimáticos*, 1ª ed., vol. 3, São Paulo, Blücher, 2001. p. 405 – 412.

PASSOS, J. B. Reúso de água: uma proposta de redução do consumo de água em curtumes. 99p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

RAMOS, M. L. A. and LIU, C. K. A novel system of removing Décorin, A minor proteoglycan of Bovine Hides, to improve the quality of leather. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 105, 222 – 228, 2010.

REED, R. *Science for Studies of Leather Technology*. Oxford, Pergamon Press Ltd., 1996, p.140.

REICH, G. From collagen to leather – the teorical background. 337p., Ludwigshafen. 2007. p.4-8.

SANTELLI, H. Uso de enzimas en la industria del cuero. *Tecnologia del cuero*, Ano 14, n. 57, 40 - 41, 2006

SCHLOEGL, W.; KLEIN, A.; FÜRST, R.; LEICHT, U.; SCHIEKER, M.; JUS, S.; GUEBITZ, G. M.; STACHEL, I.; MEYER, M.; WIGGENHORN, M.; FRIESS, W. Residual transglutaminase in collagen – Effects, detection, quantification and removal. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80, 282 – 288, 2012.

SEGANFREDO, T. O Caleiro sustentável, um processo otimizado, econômico e de baixo impacto ambiental. *Revista do Couro*, ed. 220, 53 – 56, 2012.

SENTHILVELAN, T.; KANAGARAJ, J.; MANDAL, A. B. Application of enzymes for dehairing of skins: cleaner leather processing. *Clean Techn Environ Policy*. Published online: February 2012.

SHI, B.; LU, X.; SUN, D. Further investigations of oxidative unhairing using hydrogen peroxide. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 98, 185 – 192, 2003

SINGH, P.; BENJAKUL, S.; MAQSOOD, S.; KISHIMURA, H. Isolation and characterization of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry*, 124, 97 -105, 2011.

SIVASUBRAMANIAN, S.; MANOHAR, B. M.; ROJARAM, A.; R. PUVANAKRISHMAN, R. . Ecofriendly lime and sulfide free enzymatic dehairing of skins and hides using a bacterial alkaline protease. *Chemosphere*, 70, 1015 – 1024, 2008a.

SIVASUBRAMANIAN, S.; MANOBAR, B. M.; PUVANAKRISHNAN, R. Mechanism of enzymatic dehairing of skins using a bacterial alkaline protease. *Chemosphere*, 70, 1025-1034, 2008b.

SOUSA, M. F. Depilação: um processo químico e bioquímico. *Revista do Couro*, ed. 186, 95 – 101, 2006.

SOUZA, F. R. and GUTTERRES, M. Application of enzymes in leather processing: a comparison between chemical and coenzymatic processes. *Brazilian J. Chem. Eng*, n.3, vol. 29, 473-481, 2012.

SOUZA, F. R. Aplicação de enzimas no processamento de couros: comparação entre processos químicos e co-enzimáticos. 133p. Dissertação (mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SUNDAR, V. J.; VEDARAMAN, N.; BALAKRISHNAN, P. A.; CHAKRABARTI, S.; MURALIDHARAN, C. Sulphide free unhairing studies on ozone based depilation. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 101, 231 – 234, 2006.

TANABE, T., OKITSU, N., TACHIBANA, A., YAMAUCHI, K. Preparation and characterization of keratin–chitosan composite film. *Biomaterials*, 23, 817 – 825, 2002.

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

TOULOUMET, Marie-Laure. Redução de odores nos curtumes. *Revista do Couro*, ed. 216, 50 – 55, 2011.

VALEIKA, V.; BELASKA, K.; VALEIKIENE, V.; KOLODZEISKIS, V. An approach to cleaner production from hair burning to hair saving using a lime-free unhairing system. *Journal of Cleaner production*, 17, 214 – 221, 2009.

VERMELHO, A. B.; PEREIRA, A. F.; COELHO, R. R. R.; PADRÓN, T. S. Práticas em Microbiologia, 256p. , Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006. p. 1-8; 69.

WANG, R.; MIN, C.; HAIMING, C.; LI, Z. Enzyme unhairing – an ecofriendly biotechnological process. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 93, 51 – 55, 2009.

WINTER, C.; SOUZA, F. R. ; GUTTERRES, M. Avaliação analítica de proteínas e gorduras para detecção de constituintes da pele em meios aquosos. In: XIX Encontro Nacional da ABQTIC, 2011, Franca. XIX Encontro Nacional da ABQTIC, 2011.

Apêndice A

Resultados Analíticos

Tabela A.1: Resultados das análises de sólidos dissolvidos totais , fixos e voláteis, nitrogênio total Kjeldahl, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, hidroxiprolina e pH nos banhos residuais.

	SDT mg g ⁻¹ de pele	SDF mg g ⁻¹ de pele	SDV mg g ⁻¹ de pele	Nitrogênio (NTK) mg g ⁻¹ de pele	Glicosaminoglicanos mg g ⁻¹ de pele	Proteoglicanos mg g ⁻¹ de pele	Hidroxiprolina µg g ⁻¹ de pele	pH
BLBc 11 + H₂O₂								
100 U g⁻¹ + 4%	56,12 ± 0,55	40,71 ± 0,87	15,41 ± 0,43	1,86 ± 0,18	0,40 ± 0,03	2,48 ± 0,65	6,88 ± 1,72	12,4 ± 0,06
100 U g⁻¹ + 8%	54,98 ± 3,17	38,00 ± 3,34	16,98 ± 0,60	2,10 ± 0,18	0,42 ± 0,03	2,79 ± 1,11	7,21 ± 0,55	12,9 ± 0,04
300 U g⁻¹ + 4%	83,04 ± 1,94	55,53 ± 1,05	27,52 ± 0,90	2,45 ± 1,21	0,72 ± 0,06	3,46 ± 0,73	15,91 ± 2,73	11,9 ± 0,10
300 U g⁻¹ + 8%	78,12 ± 1,98	51,77 ± 1,73	26,36 ± 1,06	2,13 ± 1,27	0,70 ± 0,06	4,11 ± 0,74	14,17 ± 3,06	11,7 ± 0,14
BLBc 17 + H₂O₂								
100 U g⁻¹ + 4%	56,98 ± 3,43	40,01 ± 2,27	16,97 ± 1,17	1,56 ± 0,60	0,44 ± 0,02	3,65 ± 0,96	8,02 ± 1,94	12,3 ± 0,51
100 U g⁻¹ + 8%	64,38 ± 12,28	46,30 ± 9,00	18,08 ± 3,28	1,70 ± 0,98	0,47 ± 0,06	4,45 ± 0,79	8,23 ± 1,37	12,1 ± 0,88
300 U g⁻¹ + 4%	75,67 ± 1,94	55,48 ± 0,84	26,94 ± 1,22	2,08 ± 1,24	0,69 ± 0,02	4,95 ± 0,59	16,45 ± 1,37	11,7 ± 0,39
300 U g⁻¹ + 8%	83,54 ± 10,7	56,64 ± 8,70	26,91 ± 2,11	3,78 ± 0,44	0,66 ± 0,04	4,87 ± 1,09	15,10 ± 2,41	11,5 ± 0,66
Cal-sulfeto de sódio	73,46	53,37	20,09	4,72	0,00	0,00	0,00	14,0
BLBc 11 – 300 U g⁻¹	77,09	43,94	20,40	3,54	0,41	5,32	6,50	8,0
BLBc 17 – 300 U g⁻¹	59,98	41,30	18,68	3,10	0,47	4,05	11,09	7,9