



## USO ASSOCIADO DE ENZIMAS E PRODUTOS QUÍMICOS OXIDANTES NA DEPILAÇÃO DE PELES

Eliane Andrioli Matos Marafon, Mariliz Gutterres Soares

Laboratório de Estudos em Couro e Meio Ambiente (LACOURO)  
Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
R. Eng. Luiz Englert, s/n. Campus Central. CEP: 90040-040 - Porto Alegre - RS - BRASIL,  
E-MAIL: {andrioli, mariliz}@enq.ufrgs.br

**Resumo:** A manufatura de couros envolve uma série de etapas onde é utilizada uma grande variedade de produtos químicos. Na etapa de depilação, a pele é submetida a um drástico tratamento químico com cal e sulfeto de sódio. O uso de sulfeto de sódio pode acarretar a geração de sulfeto de hidrogênio, que é um gás tóxico. Atualmente, muitas alternativas estão sendo estudadas a fim de substituir este agente de depilação. Entre elas, a depilação com uso de enzimas e a depilação com produtos químicos oxidantes. Neste trabalho foi feita uma avaliação prévia do uso associado de enzimas e peróxido de hidrogênio na depilação de peles bovinas. Nos experimentos realizados foram utilizadas soluções enzimáticas com 100 e 200 unidades enzimáticas por grama de pele, e concentrações de 2% e 5% de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Houve remoção de pelos em ambos os experimentos. Com isto, verifica-se a possibilidade da associação de enzimas e produtos químicos oxidantes na depilação, como alternativa à depilação convencional.

**Palavras-chave:** depilação, peles, enzimas, produtos químicos oxidantes.

### 1. Introdução

A depilação é uma etapa essencial entre as operações de ribeira, antes do curtimento, em que o pelo, junto com a epiderme, proteínas e outras substâncias não colagênicas são removidas da pele. Convencionalmente, isto é conseguido usando cal e um agente redutor como o sulfeto de sódio.

O processo de depilação é feito para atender os seguintes objetivos: retirar o pelo ou a lã da pele, remover a epiderme, intumescer e separar as fibras e fibrilas do colagênio. O sistema mais usado e conhecido é o sistema cal-sulfeto.

O sulfeto de sódio é empregado para destruir os pelos e a epiderme, e para que haja um intumescimento da pele e desdobramento das fibras é empregado o óxido de cálcio (cal) que em água é convertido a hidróxido como fonte de álcali, elevando o pH do meio (AQUIM, 2009).

Cal e sulfeto de sódio são comumente usados na etapa de depilação devido a sua vantagem econômica, apesar de sua natureza altamente poluente.

O sulfeto de sódio é usado como agente de depilação. Isto traz um risco associado com a geração de sulfeto de hidrogênio, que em termos de segurança apresenta uma ameaça permanente para os trabalhadores. Um efeito ainda mais negativo é a geração de resíduos sólidos que contêm sulfeto (MORERA *et al.*, 2008).

Atualmente, como uma alternativa à depilação química, a depilação com base em enzimas usando proteases, evitando o uso de cal e sulfeto, está sendo

desenvolvida devido a seus benefícios ambientais (SIVASUBRAMANIAN *et al.*, 2008).

As vantagens da depilação enzimática são: ação simultânea de depilação e purga, a pele é limpa em ambos os lados, o pelo não é destruído, a depilação enzimática resulta em uma significativa redução nos parâmetros de poluição, assim como a toxicidade (WANG *et al.*, 2009).

As desvantagens são que os processos enzimáticos são mais caros do que os processos convencionais, requerem controle cuidadoso e, por causa do efeito sobre a estrutura dos couros e peles, podem exigir mudanças nas etapas subsequentes do processo (TAYLOR *et al.*, 1987).

Claramente, a complicação do uso de enzimas no processo de depilação é o risco de danificar a valiosa camada flor se a enzima não puder ser controlada de uma maneira apropriada. Esta é particularmente pertinente se a qualidade da matéria-prima é ruim e com alguma degradação das proteínas estruturais dentro do substrato pele. O objetivo principal consiste na remoção completa do pelo da camada flor, incluindo a zona da raiz, sem modificar as proteínas do colágeno da derme.

Estudos físico-químicos conclusivos mostram que couros produzidos por processos enzimáticos são equivalentes ou melhores que aqueles obtidos por outros sistemas. Assim o desenvolvimento de processos enzimáticos oferece um imenso potencial para o modo “verde” de depilação de peles na indústria coureira, junto à excelência ambiental (SIVASUBRAMANIAN *et al.*, 2008).

Outra alternativa à depilação convencional é a depilação oxidativa. Produtos químicos oxidantes

oferecem uma alternativa ao uso de sulfeto de sódio em uma rápida reação de depilação (MARMER *et al.*, 2003).

Produtos químicos oxidantes têm sido investigados como alternativas aos produtos químicos redutores para aplicação na depilação (GEHRING *et al.*, 2003). Embora os resultados obtidos por este método de depilação sejam satisfatórios, ele causa a destruição dos pelos, resultando na alta contaminação do efluente (MARSAL *et al.*, 2002).

A aplicação de depilação por processos oxidativos com recuperação do pelo permitiria a substituição do sulfeto e a redução da carga de poluentes nas águas residuais resultantes. Embora, neste caso, seja necessária a imunização do pelo (MARSAL *et al.*, 2002).

Estudos recentes revelaram que pH de 12,5 e oferta de 8% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são necessários para que as peles sejam depiladas satisfatoriamente. Acima destas condições o pelo é destruído (MARSAL *et al.*, 2002).

O processo de depilação alternativa baseado no uso de peróxido de hidrogênio permite substituir o uso de sulfeto. Para avaliar a qualidade do couro final (obtido através do processo de depilação oxidativa), várias atividades experimentais foram realizadas, tanto em laboratório quanto em escala industrial. Os resultados mostraram que os couros obtidos são comparáveis aos obtidos pelo processo tradicional em termos de propriedades físico-mecânicas e técnicas. Além disso, o processo provou ser prático e econômico de ser implantado, porque é compatível com as máquinas existentes já instaladas na planta (CASTIELLO *et al.*, 2008).

Tanto o sulfeto de sódio quanto o peróxido de hidrogênio agem em condições altamente alcalinas. Entretanto, o sulfeto de sódio age como um redutor, enquanto que o peróxido de hidrogênio atua como um oxidante, decompondo-se e transformando-se em água. Os efluentes gerados são, assim, menos poluentes e mais facilmente reutilizáveis (MORERA *et al.*, 2006). Assim, a depilação oxidativa com uma prévia imunização do pelo, ou seja, com recuperação do pelo, acarretaria numa significativa redução na descarga de poluentes.

Além do peróxido de hidrogênio, outros produtos químicos oxidantes vêm sendo estudados como agentes de depilação, como por exemplo, o peróxido de cálcio e o peróxido de magnésio (GEHRING *et al.*, 2003 e 2006).

Em experimentos posteriores serão testadas enzimas, produzidas por microorganismos, associadas a produtos químicos oxidantes e/ou outros produtos. Serão utilizadas enzimas produzidas por colônias da bactéria *Bacillus subtilis*, isoladas e selecionadas por DETTMER (2010). Serão avaliados os seguintes itens: concentração de enzimas, concentração dos produtos químicos, tempo de processo, ordem da adição dos produtos e pH do meio.

O presente trabalho tem por objetivo fazer uma investigação preliminar do uso associado de enzimas com um produto químico oxidante na depilação de peles bovinas. Os experimentos foram realizados com uma enzima comercial e com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Neste trabalho optou-se por trabalhar com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pois, conforme observado na revisão bibliográfica, este é um dos produtos oxidantes mais testados na depilação de peles, apresentando resultados satisfatórios.

Nestes testes foi avaliada apenas a remoção de pelos, de forma visual. Não sendo, portanto, realizada nenhuma análise nos banhos.

## 2. Materiais e Métodos

A seguir será descrita a metodologia aplicada na realização destes experimentos preliminares, e, uma breve discussão do que se pretende aplicar em experimentos posteriores.

### 2.1. Materiais

Nestes experimentos, os reagentes utilizados para a depilação de peles foram: enzima comercial Buzyme 7703 (Buckmann) e peróxido de hidrogênio (Proton Química). Foram utilizadas peles bovinas salgadas e pré-descarnadas.

### 2.2. Atividade proteolítica

Foram preparadas duas soluções enzimáticas, uma para cada experimento, onde a atividade proteolítica de cada solução foi determinada pela caracterização enzimática com azocaseína.

A determinação da atividade proteolítica das soluções foi baseada em GOINGO *et al.* (2007) *apud* DETTMER (2010). Foram preparadas duas soluções enzimáticas, uma com 2 mg de enzima comercial/mL de água destilada, para o primeiro experimento, e outra com 4 mg de enzima comercial/mL de água destilada, para o segundo experimento. A mistura de reação continha 100µL de substrato (azocaseína 10 mg/mL), 100µL de tampão e 100µL de solução enzimática. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C e a reação foi interrompida adicionando-se 500µL de solução de TCA (ácido tricloroacético) 10%. Após centrifugação a 10.000g por 5 minutos, 800µL do sobrenadante foram adicionados a 200µL de solução de NaOH 1,8N. A leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro UV-visível da Varian, modelo Cary 1E, no comprimento de onda de 420nm. Uma unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,01 a 420nm nas condições de tempo e temperatura do teste. O “branco” é realizado adicionando-se as mesmas quantidades de tampão e substrato ao TCA. As análises foram feitas em triplicata. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 1.

**Tabela 1.** Resultado da análise de atividade proteolítica

Concentração da solução (mg de enzima/mL de H <sub>2</sub> O destilada)	Atividade proteolítica (U/mL)
2	73,42
4	97,08

A quantidade de solução a ser adicionada em cada fulão de teste foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$V = \frac{u. e. \times \text{gramas de pele}}{\text{atividade proteolítica}}$$

Onde:

V = volume de solução enzimática a ser adicionado no fulão (mL)

u.e. = unidades enzimáticas/grama de pele (concentração desejada)

Foram utilizadas: solução de 100 unidades enzimáticas/grama de pele, no primeiro experimento, e solução de 200 unidades enzimáticas/grama de pele, no segundo experimento.

### 2.3. Cultivo de microorganismos

Nos próximos experimentos serão testadas enzimas proteolíticas produzidas pela bactéria *Bacillus subtilis*. Serão utilizadas duas colônias, chamadas BLBc 11 e BLBc 17, isoladas e selecionadas por DETTMER (2010). O meio utilizado para seleção das bactérias com atividade proteolítica foi LB + leite (1%).

O meio de cultivo destes microorganismos é composto por sais que tamponam o meio, fontes de vitaminas (extrato de levedura) e fonte de nitrogênio e carbono (farelo de soja).

As enzimas produzidas serão utilizadas na depilação de peles bovinas em associação com produtos químicos oxidantes e/ou outros produtos, como por exemplo, hidróxido de cálcio para imunização dos pelos.

### 2.4. Procedimento experimental

O procedimento experimental seguido para a realização destes testes preliminares está descrito abaixo.

As peles foram cortadas em pedaços de aproximadamente 100 g (peso seco – peles salgadas). Em cada fulão foram colocados dois pedaços de pele. Os testes foram realizados no Sistema de fulões, modelo OXY – 62 da Oxylab, ilustrado na figura 1.



Figura 1. Sistema de fulões utilizado nos experimentos.

Foram realizados dois experimentos de depilação, conduzidos conforme a formulação descrita nas tabelas 1 e 2, após as peles terem sido remolhadas.

Na primeira formulação, a etapa enzimática foi realizada com solução 100 unidades enzimáticas por grama de pele. A etapa química foi realizada com duas concentrações diferentes de peróxido de hidrogênio: 5 e 2%.

Na segunda formulação a etapa enzimática foi realizada com solução 200 unidades enzimáticas por grama de pele, e a etapa química nas mesmas condições do primeiro experimento.

Em ambos os experimentos foram adicionados 4% de

hidróxido de sódio, a fim de alcalinizar o meio para a etapa química.

Tabela 2. Formulação utilizada no primeiro experimento

Etapas	Formulação	Tempo
Depilação enzimática	100 unidades enzimáticas/g de pele	2 horas
Esgotamento do banho Depilação química	100% H <sub>2</sub> O 4% NaOH	10 minutos
Esgotamento do banho	Fulão 1: 5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Fulão 2: 2% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2 horas

Tabela 3. Formulação utilizada no segundo experimento

Etapas	Formulação	Tempo
Depilação enzimática	200 unidades enzimáticas/g de pele	2 horas
Esgotamento do banho Depilação química	100% H <sub>2</sub> O 4% NaOH	10 minutos
Esgotamento do banho	Fulão 1: 5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Fulão 2: 2% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2 horas

A seguir, as peles foram avaliadas visualmente quanto à remoção de pelos.

Nos próximos trabalhos, a depilação será analiticamente avaliada pelo emprego de métodos de determinação de proteínas: hidroxiprolina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e NTK (Nitrogênio Total Kjeldahl).

A análise de Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK) tem por objetivo quantificar a matéria orgânica removida das peles. O nitrogênio amoniacal refere-se ao nitrogênio já na forma de amônia livre na amostra. O nitrogênio total Kjeldahl representa a soma do nitrogênio amoniacal com o nitrogênio orgânico (BAUR *et al.*, 2011).

Hidroxiprolina é um componente importante da proteína colágeno. Esse aminoácido é característico do colágeno, sendo pouco encontrado em outras proteínas. Por esta razão, o conteúdo de hidroxiprolina tem sido utilizado como um indicador para a determinação de colágeno. O método é utilizado para a determinação da hidroxiprolina na pele e produtos contendo colágeno.

Proteínas extracelulares ligadas a glicosaminoglicanos (estruturas que possuem um dos açúcares aminados e normalmente sulfatados) formam os proteoglicanos.

Glicosaminoglicanos, também denominadas mucopolissacarídeos, são carboidratos lineares de peso molecular elevado, formados pela polimerização do ácido urônico e hexosamina (glicosamina ou galactosamina). A estimativa de glicosaminoglicanos é feita através do ensaio da modificação do azul de dimetilmetileno (MADHAN *et al.*, 2010).

Além dos métodos de determinação de proteínas serão realizados testes de arranque de pelo, microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

### 3. Resultados e Discussões

Estes experimentos preliminares foram realizados a fim de verificar a viabilidade do trabalho proposto. Assim sendo, avaliou-se apenas a remoção dos pelos, não sendo realizadas análises nos banhos.

Ao final de cada etapa da depilação (enzimática e química), as peles foram visualmente avaliadas.

Em ambos os experimentos, após a depilação enzimática, os pelos ainda não haviam se desprendido, mas poderiam ser removidos mecanicamente, o que indica o ataque enzimático.

Ao final da etapa química, as peles foram novamente avaliadas. Os resultados encontram-se na tabela 4.

**Tabela 4.** Resultados obtidos após a etapa de depilação química

Experimento	Formulação	Resultados
Experimento 1	Fulão 1: 5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Fulão 2: 2% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Remoção total dos pelos
Experimento 2	Fulão 1: 5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Fulão 2: 2% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Remoção parcial dos pelos

Verificou-se que, em ambos os experimentos, houve remoção dos pelos, sendo que no experimento 1 observou-se os melhores resultados.

A figura 2 apresenta a pele em seu estado inicial. A partir da qual os resultados foram visualmente avaliados.



**Figura 2.** Amostra de pele em seu estado inicial.

As figuras 3 e 4 referem-se ao resultado visual do primeiro experimento.



**Figura 3.** Amostra ao final do primeiro experimento com 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 4.** Amostra ao final do primeiro experimento com 2% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

No primeiro experimento as peles ficaram levemente amareladas, sendo que no teste realizado com 2% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a coloração foi mais intensa.

As figuras 5 e 6 referem-se ao resultado visual do segundo experimento.



**Figura 5.** Amostra ao final do segundo experimento utilizando 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 6.** Amostra ao final do segundo experimento com 2% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

No segundo experimento também foi percebido um leve amarelamento nas peles, sendo que no teste realizado com 2% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, praticamente não houve alteração de cor.

#### 4. Conclusão

Nestes experimentos prévios, verificou-se que a utilização de enzimas e peróxido de hidrogênio mostrou-se eficiente na depilação de peles bovinas.

Os resultados deste trabalho mostraram que é possível a associação de enzimas e peróxido de hidrogênio na depilação de peles.

Para a elaboração da dissertação de mestrado será feito um planejamento experimental e serão realizados estudos mais detalhados e aprofundados, como por exemplo, a análise dos banhos.

#### 5. Referências

AQUIM, P. M. *Gestão em Curtumes: Uso Integrado e Eficiente da Água*. Tese de Doutorado, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, 2009.

BAUR, L.; GUTTERRES, M.; BORDIGNON, S. R. Estudo e Identificação de Nitrogênio de Efluentes de Curtume. In: ENCONTRO NACIONAL DOS QUÍMICOS E TÉCNICOS DA INDÚSTRIA DO COURO, **19**., 2011, Franca, Anais.

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

DETTMER, A. *Biotecnologia Aplicada Ao Setor Coureiro*. Exame de Qualificação ao Doutorado, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, 2010.

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 unhairing 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 Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 375-382, 2007.

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

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.

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

MORERA, J. M.; BACARDIT, A.; O, LLUÍS.; BATOLÍ, E.; BORRÀS, M. D. Minimization of the environmental impact in the unhairing of bovine hides. *Chemosphere*, **72**, 1681-1686, 2008.

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

REVISTA DO COURO, Esclarecendo o Processo de Depilação, **146**, 49-51, 2001.

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

SIVASUBRAMANIAM, B.; MANOHAR, B. M.; RAJARAM, A.; PUVANAKRISHNAN, R. Ecofriendly lime and sulfite free enzymatic dehairing of skins and hides using a bacterial alkaline protease. *Chemosphere*, **70**, 1015-1024, 2008.

TAYLOR, M.M.; BAILEY, D. G.; FEAIRHELLER, S. H. A review of the uses of enzymes in the tannery. *Journal of the American Leather Chemists Association*, **82**, 153-165, 1987.

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