

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

**DESEMPENHO DE MICROBICIDAS PARA
PRESERVAÇÃO DE PELES E COUROS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Juliana Tolfo da Fontoura

Porto Alegre

2013

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

DESEMPENHO DE MICROBICIDAS PARA PRESERVAÇÃO DE PELES E COUROS

Juliana Tolfo da Fontoura

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

Área de concentração: Pesquisa e
desenvolvimento de processos.

Orientadores:

Prof^a. Dr^a. Mariliz Gutterres

Prof. Dr. Adriano Brandelli

Porto Alegre

2013

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 *Desempenho de microbicidas para a preservação de peles e couros*, elaborada por Juliana Tolfo da Fontoura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Celso Camilo Moro

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - PPGEQ

Prof^ª. Dr^ª. Marcia Schultz

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-Riograndense
IFSul.

Prof^ª. Dr^ª. Patricia Valente

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – ICBS

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus e a minha mãe que iluminaram meu caminho durante esta caminhada, guiando-me às escolhas certas.

Ao meu pai, o qual amo muito, por ser um exemplo de vida e ao meu querido irmão, pela confiança, amor e incentivo.

À professora Mariliz Gutterres orientadora, professora e amiga, um muito obrigada pela dedicação e ajuda para a realização deste trabalho.

Ao professor Adriano Brandelli, por toda a ajuda e pela disponibilidade.

A todos os amigos minha segunda família, que fortaleceram os laços de igualdade, num ambiente fraterno e respeitoso.

Aos amigos do Laboratório de Estudos em Couro e Meio Ambiente (LACOURO), pela convivência alegre e ajuda prestada durante todo período desse trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado e pela estrutura oferecida.

A CAPES e ao CNPq pelo financiamento desta pesquisa.

Resumo

Um problema na indústria coureira é a deterioração de peles e couros devido ao desenvolvimento de microrganismos no processamento do couro. As peles e os couros contêm nutrientes adequados para o crescimento de microrganismos, como carboidratos, gorduras e proteínas, além das condições ambientais, alta umidade, temperatura de armazenagem e pH favoráveis. Alguns gêneros de bactérias e fungos sintetizam importantes substâncias deste substrato, causando modificações prejudiciais na superfície do couro e nas propriedades físico-mecânicas, deixando manchas pigmentadas de difícil remoção, afetando a qualidade do produto final e causando perda de valor comercial. Desta forma, surge a necessidade de desenvolver estratégias de controle dos microrganismos de modo a reduzir ou eliminar este problema. Para tanto, recorre-se comumente à utilização de microbicidas. No passado, a ação esperada dos agentes antimicrobianos era principalmente de fornecer uma proteção eficaz, mas em anos mais recentes, a preocupação com a sua toxicidade e com potenciais riscos ecológicos tornou-se também importante. Nos dias atuais uma grande preocupação mundial é o cuidado com a preservação do meio ambiente. Devido a isto, várias pesquisas estão voltadas para o desenvolvimento de novas tecnologias limpas e renováveis como também a otimização de processos. Tendo em vista a melhoria de processos no que diz respeito ao uso de microbicidas adicionados em peles e couros, para prevenir a contaminação dos mesmos por microrganismos, esta dissertação centrou-se na avaliação do desempenho de microbicidas comerciais convencionalmente utilizados na indústria do couro sendo eles 2-(tiocianometiltio) benzotiazole (TCMTB), isotiazolina, dispersão oleosa de 2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona + carbendazim (OIT+BMC/óleo), dispersão aquosa de 2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona + carbendazim (OIT+BMC/água), 2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona (OIT) e para-cloro-meta-cresol (PCMC) contra as espécies de bactérias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptomyces sp.* e as

espécies de fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium herguei* e *Penicillium chrysogenum*. Os microbicidas foram aplicados nas etapas de remolho, píquel, curtimento de couro com cromo e curtimento/engraxe com tanino vegetal. Os efeitos antimicrobianos dos microbicidas foram avaliados através de ensaios microbiológicos acelerados de plaqueamento e de acondicionamento em câmara tropical e testes de biodeterioração no solo, seguidos de análises visual, Microscopia eletrônica de varredura e ensaio de tração. Também foi testada a sorção e *wash-out* dos microbicidas em couros wet-blue. Outro teste feito nos próprios microbicidas foi o de concentração inibitória mínima (MIC). Os resultados demonstraram baixa capacidade antibacteriana e antifúngica dos microbicidas selecionados quando aplicados no processo de remolho contra o ataque das bactérias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces sp.* e no processo de engraxe para o couro curtido com tanino vegetal contra o ataque dos fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*. Dois dos microbicidas estudados, TCMTB e OIT+BMC/água aplicados no couro wet-blue, revelaram elevada capacidade antifúngica contra os quatro diferentes fungos testados. Dos microbicidas submetidos ao teste de absorvidade e *wash-out*, o microbicida à base de TCMTB apresentou alta e rápida absorvidade pelo couro wet-blue, além de possuir resistência à lavagem.

Palavras chaves: Microbicidas, Biodeterioração do couro, Testes microbiológicos acelerados

Abstract

A problem in the leather industry is the deterioration of leather skins due to the development of microorganisms, in the processing of leather. The skin and leather containing nutrients suitable for the growth of microorganisms such as carbohydrates, fats and proteins, as well as environmental conditions, high humidity, storage temperature and pH favorable. Some genera of bacteria and fungi synthesize important ingredients of this substrate, causing harmful changes in the surface of the leather and the physical and mechanical properties, leaving pigmented spots are difficult to remove, affecting the quality of the final product and loss of commercial value. Thus, there arises the need to develop strategies for control of microorganisms in order to reduce or eliminate this problem, therefore, appeal commonly the use of microbicides. In the past, the expected action of antimicrobial agents was mainly to provide effective protection, but in more recent years, concerns about the toxicity and potential ecological risks has also become important. Nowadays a major global concern is the careful preservation of the environment, due to this many researches are focused on the development of new clean and renewable technologies as well as process optimization. In view of the improvement of processes in respect to the use of microbicides added to hides and skins to prevent contamination thereof by microorganisms, this work has focused on the evaluation of the performance of commercial microbicides conventionally used in the leather industry, 2-metiltiocianato benzothiazole (TCMTB) isothiazoline, oily dispersion of 2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona + carbendazim (OIT+BMC/oil), water dispersion of 2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona + carbendazim (OIT+BMC/water), 2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona (OIT) and para-chloro-meta-cresol (PCMC), against the bacterial species *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosas* and *Streptomyces sp. e* species of fungi *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, and *Penicillium herguei* *Penicillium chrysogenum*, compared with the control. Microbicides were applied in

steps of soaking, pickling, chrome tanning and grease/tanning with vegetable tannin. The antimicrobial effects of microbicides made for these applications were evaluated by accelerated plating microbiological testing and tropical chamber rain and biodegradation tests on the ground, followed by analysis (visual , SEM and tensile test) . Also was tested the absorptivity and wash-out of microbicides in wet-blue leather. Another test done on their own microbicides was the minimal inhibitory concentration (MIC). The results showed low capacity antibacterial and antifungal activities of selected microbicides when applied in the process of soaking the attack of the bacteria *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces*. sp. e in the process of grease for leather vegetable tannin against fungal attack *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*. Two of microbicides studied TCMTB and OIT + BMC/water applied in wet-blue leather, high capacity antifungal against revealed four different fungi tested. For microbicides tested for absorbency and wash-out the microbicide based TCMTB showed high and rapid absorbency by wet-blue leather also has resistance to washing.

Keywords: Microbicides, Biodeterioration leather, Accelerated microbiological testing

Sumário

Introdução	1
Revisão bibliográfica.....	5
2.1 Estrutura da pele	5
2.1.1 Zonas da pele	8
2.1.2 O colágeno	8
2.2 Processamento do couro	9
2.2.1 Ribeira	9
2.2.2 Curtimento	12
2.2.3 Acabamento	14
2.3 Biodeterioração do couro	16
2.3.1 Microrganismos deteriorantes e mecanismo de ação	17
2.3.2 Ataque bacteriano às peles	19
2.3.2.1 Etapas suscetíveis ao ataque bacteriano	20
2.3.3 Ataque fúngico a peles e couros	23
2.3.3.1 Etapas suscetíveis ao ataque fúngico	25
2.4 Microbicidas	26
2.4.1 Composição de um microbicida	28
2.4.2 Ação e classificação dos microbicidas	29
2.4.3 Microbicidas aplicados na indústria do couro	31
2.4.4 Principais microbicidas utilizados na indústria coureira	32
2.4.4.1 Microbicidas fenólicos sintéticos	32
2.4.4.2 Microbicidas heterocíclicos sintéticos	33
2.4.5 Estudos realizados com diferentes microbicidas em couros.....	37
2.4.6 Metabólitos naturais com uso no desenvolvimento biotecnológico	39
2.4.6.1 Trabalhos realizados pelo LACOURO em biotecnologia	40
Metodologia experimental.....	43
3.1 Microbicidas testados	44
3.2 Microrganismos contaminantes utilizados	44
3.2.1. Repicagem e Preparação das Suspensões	45
3.3 Experimentos para aplicação dos microbicidas em peles e couros	46
3.3.1 Experimentos de remolho	47
3.3.2 Experimentos de Píquel	48
3.3.3 Curtimento com cromo	49
3.3.4 Curtimento com tanino vegetal.....	51
3.4 Testes microbiológicos das peles e couros	52
3.4.1 Determinação da resistência ao ataque bacteriano por plaqueamento.....	52
3.4.2 Determinação da resistência ao ataque fúngico por plaqueamento	53
3.4.3 Câmara tropical.....	54
3.4.4 Processo de biodeterioração no solo.....	56
3.5 Ensaio de tração no couro.....	57
3.6 Determinação da concentração inibitória mínima	57
3.7 Sorção e “wash-out”	59

Resultados e discussão	63
4.1 Ataque bacteriano por plaqueamento em peles remolhadas.....	63
4.2 Ataque fúngico por plaqueamento.....	66
4.2.1 Em peles Piqueladas	66
4.2.2 Em couros wet-blue	71
4.2.3 Em couros curtidos com tanino vegetal.....	77
4.3 Câmara Tropical	84
4.4 Processo de biodeterioração em solo.....	84
4.5 Ensaio de tração no couro.....	85
4.6 Determinação da concentração inibitória mínima	86
4.7 Sorção e “wash-out”.....	87
4.8 Manchas e danos causados pelo ataque fúngico.....	93
Conclusões e sugestões para trabalhos futuros	99
Referências bibliográficas	103
Anexo I.....	113
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xvi

Lista de figuras

Figura 2.1: Estrutura da pele bovina.....	6
Figura 2.2: Zonas da pele.....	8
Figura 2.3: Tripla hélice da molécula de colágeno.....	9
Figura 2.4: Etapas de processamento do couro suscetíveis a ataques por bactérias e fungos.....	17
Figura 2.5: Amostras de peles remolhadas contaminadas com (a) <i>Bacillus subtilis</i> , (b) <i>Streptomyces</i> sp.....	19
Figura 2.6: Curva típica do desenvolvimento de bactérias em remolho sem conservante.....	21
Figura 2.7: Amostras de couros contaminadas com (a) <i>Aspergillus niger</i> , (b) <i>Aspergillus flavus</i> , (c) <i>Penicillium chrysogenum</i> , (d) <i>Penicillium herguei</i>	24
Figura 2.8: Representação esquemática dos potenciais alvos ativos dos microbicidas nas bactérias.....	29
Figura 2.9: Representação esquemática dos potenciais alvos ativos dos microbicidas nos fungos.....	30
Figura 2.10: Estrutura molecular dos principais microbicidas usados na indústria do couro.....	37
Figura 3.1: Fulão de bancada utilizado para os testes de aplicação de microbicidas em peles e couros.....	47
Figura 3.2: Pedacos de peles utilizadas no processo de remolho.....	48
Figura 3.3: Pontos de inoculação (x) da suspensão de bactérias nas placas.....	53
Figura 3.4: Pontos de inoculação (x) da suspensão de esporos.....	54
Figura 3.5: Sugestão de construção da câmara tropical.....	54
Figura 3.6: Câmara tropical adaptada para o experimento.....	56
Figura 3.7: (a) amostras de couro utilizadas no teste e (b) disposição dos couros na câmara tropical.....	56

Figura 3.8: Espectro de absorção do microbicida à base de TCMTB.....	59
Figura 3.9: Espectro de absorção do microbicida à base de OIT+BMC/água.....	59
Figura 3.10: Espectro de absorção do microbicida à base de PCMC.....	60
Figura 3.11: Curva de calibração para o microbicida à base de TCMTB.....	60
Figura 3.12: Curva de calibração para o microbicida à base de OIT+BMC/água.....	61
Figura 3.13: Curva de calibração para o microbicida à base de PCMC.....	61
Figura 4.1: Crescimento da bactéria <i>Bacillus subtilis</i> nas amostras de peles remolhadas tratadas com microbicidas, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT+BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT.....	64
Figura 4.2: Crescimento da bactéria <i>Escherichia coli</i> , nas amostras de peles remolhadas tratadas com microbicidas, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT+BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT.....	64
Figura 4.3: Crescimento da bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , nas amostras de peles remolhadas tratadas com microbicidas, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT+BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT.....	65
Figura 4.4: Crescimento da bactéria <i>Streptomyces .sp</i> nas amostras de peles remolhadas tratadas com microbicidas, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT+BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT.....	65
Figura 4.5: Crescimento do fungo <i>Aspergillus niger</i> nos ensaios em duplicata (amostra de cima com a amostra de baixo) em peles piqueladas, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT.....	67
Figura 4.6: Crescimento do fungo <i>Aspergillus flavus</i> nos ensaios em duplicata (amostra de cima com a amostra de baixo) em peles piqueladas, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT.....	67
Figura 4.7: Crescimento do fungo <i>Penicillium herguei</i> nos ensaios em duplicata (amostra de cima com a amostra de baixo) em peles piqueladas, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT.....	67
Figura 4.8: Crescimento do fungo <i>Penicillium chrysogenum</i> nos ensaios em duplicata (amostra de cima com a amostra de baixo) em peles piqueladas, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT.....	68

Figura 4.9: Diminuição da distância de inibição da pele piquelada contaminada com <i>Aspergillus niger</i>	69
Figura 4.10: Diminuição da distância de inibição da pele piquelada contaminada com <i>Aspergillus flavus</i>	69
Figura 4.11: Diminuição da distância de inibição da pele piquelada contaminada com <i>Penicillium herguei</i>	70
Figura 4.12: Diminuição da distância de inibição da pele piquelada contaminada com <i>Penicillium chrysogenum</i>	70
Figura 4.13: Crescimento do fungo <i>Aspergillus niger</i> nos ensaios em duplicata (amostra de cima com a de baixo) em wet-blue. Da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água, OIT e PCMC.....	72
Figura 4.14: Crescimento do fungo <i>Aspergillus flavus</i> nos ensaios em duplicata (amostra de cima com a de baixo) em wet-blue. Da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água, OIT e PCMC.....	72
Figura 4.15: Crescimento do fungo <i>Penicillium herguei</i> nos ensaios em duplicata (amostra de cima com a de baixo) em wet-blue. Da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água, OIT e PCMC.....	72
Figura 4.16: Crescimento do fungo <i>Penicillium chrysogenum</i> nos ensaios em duplicata (amostra de cima com a de baixo) em wet-blue. Da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água, OIT e PCMC.....	73
Figura 4.17: Diminuição da distância de inibição no couro wet-blue contaminado com <i>Aspergillus niger</i>	73
Figura 4.18: Diminuição da distância de inibição no couro wet-blue contaminado com <i>Aspergillus flavus</i>	74
Figura 4.19: Diminuição da distância de inibição no couro wet-blue contaminado com <i>Penicillium herguei</i>	74
Figura 4.20: Diminuição da distância de inibição no couro wet-blue contaminado com <i>Penicillium chrysogenum</i>	75
Figura 4.21: Crescimento do fungo <i>Aspergillus niger</i> nas amostras de couro wet-blue tratadas com 0,1 e 0,4 % dos microbicidas.....	76
Figura 4.22: Crescimento do fungo <i>Aspergillus flavus</i> nas amostras de couro wet-blue tratadas com 0,1 e 0,4 % dos microbicidas.....	76
Figura 4.23: Crescimento do fungo <i>Penicillium herguei</i> nas amostras de couro wet-blue tratadas com 0,1 e 0,4 % dos microbicidas.....	77

Figura 4.24: Crescimento do fungo <i>Penicillium chrysogenum</i> nas amostras de couro wet-blue tratadas com 0,1 e 0,4 % dos microbicidas.....	77
Figura 4.25: Crescimento do fungo <i>Aspergillus niger</i> nos ensaios em duplicata (amostra de cima com a amostra de baixo) em couro de curtimento vegetal, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT.....	78
Figura 4.26: Crescimento do fungo <i>Aspergillus flavus</i> nos ensaios em duplicata (amostra de cima com a amostra de baixo) em couro de curtimento vegetal, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT.....	79
Figura 4.27: Crescimento do fungo <i>Penicillium herguei</i> nos ensaios em duplicata (amostra de cima com a amostra de baixo) em couro de curtimento vegetal, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT.....	79
Figura 4.28: Crescimento do fungo <i>Penicillium chrysogenum</i> nos ensaios em duplicata (amostra de cima com a amostra de baixo) em couro de curtimento vegetal, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT.....	79
Figura 4.29: Diminuição da distância de inibição em couros de curtimento vegetal contaminados com <i>Aspergillus niger</i>	80
Figura 4.30: Diminuição da distância de inibição em couros de curtimento vegetal contaminados com <i>Aspergillus flavus</i>	80
Figura 4.31: Diminuição da distância de inibição em couros de curtimento vegetal contaminados com <i>Penicillium herguei</i>	81
Figura 4.32: Diminuição da distância de inibição em couros de curtimento vegetal contaminados com <i>Penicillium chrysogenum</i>	81
Figura 4.33: Crescimento do fungo <i>Aspergillus niger</i> nas amostras de couro de curtimento vegetal tratadas com ofertas de 0,5 e 0,75 % dos microbicidas.....	82
Figura 4.34: Crescimento do fungo <i>Aspergillus flavus</i> nas amostras de couro de curtimento vegetal tratadas com ofertas de 0,5 e 0,75 % dos microbicidas.....	82
Figura 4.35: Crescimento do fungo <i>Penicillium herguei</i> nas amostras de couro de curtimento vegetal tratadas com ofertas de 0,5 e 0,75 % dos microbicidas.....	83
Figura 4.36: Crescimento do fungo <i>Penicillium chrysogenum</i> nas amostras de couro de curtimento vegetal tratadas com ofertas de 0,5 e 0,75 % dos microbicidas.....	83

Figura 4.37: Porcentagem do microbicida TCMTB sorvida pelo couro wet-blue.....	88
Figura 4.38: Porcentagem do microbicida OIT + BMC/água sorvida pelo couro wet-blue.....	88
Figura 4.39: Porcentagem do microbicida PCMC sorvida pelo couro wet-blue.....	89
Figura 4.40: Porcentagem dessorvida do microbicida TCMTB pelo couro wet-blue.....	91
Figura 4.41: Porcentagem dessorvida do microbicida OIT + BMC/água pelo couro wet-blue.....	91
Figura 4.42: Porcentagem dessorvida do microbicida PCMC pelo couro wet-blue.....	92
Figura 4.43: Manchas de difícil remoção em amostras de couros wet-blue causadas pelo fungo <i>Aspergillus niger</i>	93
Figura 4.44: Manchas de difícil remoção em amostras de couros curtidos com tanino vegetal causadas pelo fungo <i>Aspergillus niger</i>	93
Figura 4.45: Degradação das amostras de peles piqueladas causadas pelo fungo <i>Aspergillus niger</i>	94
Figura 4.46: Manchas de difícil remoção em amostras de couros curtidos com tanino vegetal causadas pelo fungo <i>Penicillium herguei</i>	94
Figura 4.47: Manchas de difícil remoção em amostras de peles piqueladas causadas pelo fungo <i>Penicillium herguei</i>	95
Figura 4.48: Imagens das amostras de peles piqueladas (a) não contaminada e (b) contaminada com <i>Aspergillus niger</i>	96
Figura 4.49: Imagens das amostras de couros wet-blue (a) não contaminada, (b) contaminada com <i>Aspergillus niger</i> , (c) contaminada com <i>Aspergillus flavus</i> e (d) contaminada com <i>Penicillium herguei</i>	97
Figura 4.50: Imagens das amostras de couros curtidos com extrato vegetal (a) não contaminada, (b) contaminada com <i>Aspergillus niger</i> , (c) contaminada com <i>Aspergillus flavus</i> e (d) contaminada com <i>Penicillium herguei</i>	98

Lista de tabelas

Tabela 2.1: Classificação de biocidas de acordo com o caráter químico.....	30
Tabela 3.1: Microrganismos contaminantes testados.....	44
Tabela 3.2: Formulação de remolho com adição de microbicida.....	47
Tabela 3.3: Formulação de Píquel com adição de microbicida.....	49
Tabela 3.4: Formulação do curtimento com cromo com adição de microbicida.....	50
Tabela 3.5: Formulação do curtimento com tanino vegetal com adição de microbicida.....	51
Tabela 3.6: Diluições realizadas para os ensaios de MIC.....	58
Tabela 3.7: Concentrações utilizadas para os testes de sorção.....	62
Tabela 4.1: Distância de inibição (DI) e Crescimento superficial (CS) após 28 dias de teste, nas diferentes amostras peles piqueladas.....	66
Tabela 4.2: Distância de inibição (DI) e Crescimento superficial (CS) após 28 dias de teste, das amostras de couro wet-blue.....	71
Tabela 4.3: Distância de inibição (DI) e Crescimento superficial (CS) após 28 dias de teste, das amostras de couro com tanino vegetal.....	78
Tabela 4.4: Contaminação superficial dos couros no testes em câmara tropical.....	84
Tabela 4.5: Perda de massa das amostras submetidas ao processo de biodegradação em solo.....	85
Tabela 4.6: Tensão de ruptura dos couros wet-blue e com tanino vegetal.....	85
Tabela 4.7: Ensaio de alongamento à ruptura dos couros wet-blue e com tanino vegetal.....	86
Tabela 4.8: Concentração inibitória mínima do microbicida a base de TCMTB, OIT + BMC/água e PCMC, contra quatro diferentes fungos	87
Tabela 4.9: Concentração residual no banho do microbicida TCMTB no teste de sorção.....	87
Tabela 4.10: Concentração residual no banho do microbicida OIT + BMC/água no teste de sorção.....	87

Tabela 4.11: Concentração residual no banho do microbicida PCMC no teste de sorção.....	87
Tabela 4.12: Concentrações finais dos microbicidas presentes nas amostras tratadas no teste de sorção.....	89
Tabela 4.13: Concentração residual no banho do microbicida TCMTB durante o teste de <i>wash-out</i>	89
Tabela 4.14: Concentração residual no banho do microbicida OIT + BMC/água durante o teste de <i>wash-out</i>	90
Tabela 4.15: Concentração residual no banho do microbicida PCMC durante o teste de <i>wash-out</i>	90

Capítulo 1

Introdução

A indústria coureira destaca-se na economia brasileira, tanto pelo volume de exportações como pela geração de empregos (em torno de 39.000 postos de trabalho no ano de 2011). O Brasil é um dos grandes produtores mundiais de couro, possuindo o maior rebanho bovino comercializável do mundo e um dos maiores parques produtivos em frigoríficos e curtumes.

Calcula-se que no ano de 2011 a produção mundial de couros tenha atingido o número de 311 milhões de unidades, estando o Brasil responsável pela produção de 13,8 % da produção mundial, com uma estimativa de produção de 43 milhões de couros, e um rebanho de 205 milhões de cabeças de gado. O estado do Rio Grande do Sul no mesmo ano tinha 224 estabelecimentos de curtimento e outras preparações de couros, gerando mais de 13.500 empregos diretos e indiretos, o que representa cerca de 30 % dos empregos gerados nesta área no Brasil (ABQTIC, 2012).

O estado do Rio Grande do Sul, no ranking brasileiro, é o primeiro estado em exportação de couro com cerca de 24 %, que atualmente, está mais voltado para a oferta de matéria-prima aos produtores locais. O segundo estado com maior volume de exportação de couro é São Paulo (com 21 %), enquanto o Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), apesar de possuir boa parte do gado brasileiro, ainda exporta muito pouco (apenas 18 % do total das exportações), uma vez que ainda existem poucos curtumes na região e parte do abate do gado é feito em outros centros (Minas Gerais e São Paulo) (ABQTIC, 2012).

O processo do couro consiste em transformar a pele verde ou salgada em couro acabado através de uma série de operações e tratamentos químicos e mecânicos. Este processo é feito

em 3 fases principais (ribeira, curtimento e acabamento), subdivididas em várias etapas. A fase inicial de ribeira consiste em operações em meio aquoso que hidratam, depilam, limpam e preparam a pele para o curtimento, além da operação mecânica de descarte e de divisão da pele em duas camadas (flor e raspa). Na fase de curtimento, há adição de agentes curtentes para transformar a pele, que é um material sem estabilidade, putrescível, sem resistência térmica e mecânica em um material durável e resistente, conhecido como couro. Na fase de acabamento, são dadas as características desejadas ao produto final.

O couro é um produto natural com propriedades e características exclusivas. Produtos como calçados, vestuário, estofamentos e artigos de peleteria empregam o couro como matéria-prima. Cada artigo possui características e especificações próprias quanto ao tipo de curtimento desejado, restrições quanto à substâncias químicas tóxicas, espessura, enchimento, maciez, resistências química e mecânica, entre outras.

Um dos grandes problemas comumente encontrados na indústria coureira é a biodeterioração de peles e couros, devido ao desenvolvimento de microrganismos. A biodeterioração pode ser considerada como qualquer mudança indesejável nas propriedades do material originada pelas atividades essenciais dos microrganismos. Na indústria do couro, os curtidores têm que lidar principalmente com os dois grupos de microrganismos: bactérias e fungos, que utilizam as proteínas e gorduras presentes nas peles como fonte de nutrientes para o seu desenvolvimento e crescimento.

Se a contaminação microbiana não for contida, principalmente nas etapas de ribeira e curtimento, o produto final terá consequências prejudiciais à qualidade como manchas pigmentadas de difícil remoção, defeitos, aspereza superficial e perda de resistências físico-mecânicas, podendo sofrer danos irreversíveis, como a perda total do produto. Por este motivo recorre-se a utilização de substâncias químicas com ação microbicida. Alguns microbicidas como pentaclorofenol (PCP) que foi largamente utilizado na indústria do couro, teve em anos mais recentes o seu uso e comercialização proibidos, devido à toxicidade do seu princípio ativo e aos danos causados ao meio ambiente. Por este motivo, cresce cada vez mais a procura e desenvolvimento por microbicidas eficazes, com menor impacto ambiental e toxicológico.

Atualmente as indústrias curtidoras buscam por processos mais limpos e eficientes que reduzam o desperdício de produtos, diminuindo ou eliminando emissões de qualquer tipo de poluente ou substância tóxica, a fim de evitar impactos ambientais, principalmente no que diz respeito à utilização da água.

A transformação de peles em couros é uma arte muito antiga e ainda costumeira e requer muita pesquisa para que surjam novas técnicas viáveis aplicadas no processamento do couro. Com as crescentes exigências de mercado referente à qualidade do artigo final, o beneficiamento do couro vem sofrendo modificações e aperfeiçoamentos, a fim de acatar determinados requisitos que estejam de acordo com as normas ambientais.

Assim, este trabalho propõe, através da pesquisa, avaliar o desempenho de microbicidas, que são componentes químicos adicionados aos processos e essenciais para proteger as peles e couros contra o ataque de bactérias e fungos, tornando a produção de couros mais eficiente e sustentável, visando à otimização do processo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de microbicidas comerciais convencionalmente utilizados na indústria coureira com a finalidade de preservar peles e couros contra o desenvolvimento de bactérias e fungos.

Os efeitos dos microbicidas 2-(tiocianometiltio) benzotiazole (TCMTB), isotiazolina, dispersão oleosa de 2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona + carbendazim (OIT+BMC/óleo), dispersão aquosa de 2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona + carbendazim (OIT+BMC/água), 2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona (OIT) e para-cloro-meta-cresol (PCMC), aplicados durante o remolho e piquelagem de peles e durante o curtimento com cromo e com tanino vegetal foram estudados com quatro estirpes bacterianas, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptomyces*. sp. e quatro espécies de fungos, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium herguei* e *Penicillium chrysogenum*.

Para avaliar o desempenho dos microbicidas utilizados foram realizados testes de aplicação dos mesmos em peles (durante as etapas de remolho e píquel) e em couros (durante os curtimentos com cromo e com tanino vegetal), o que foi avaliado através de ensaios microbiológicos acelerados de plaqueamento e de acondicionamento em câmara tropical e testes de biodeterioração no solo, sendo feitas análises pertinentes (visual, MEV e ensaio de tração). Também foi testada a absorvidade e *wash-out* dos microbicidas em couros wet-blue. Outro teste feito nos próprios microbicidas foi o de concentração inibitória mínima (*Minimum inhibitory concentration*, MIC).

O presente trabalho está estruturado em 5 capítulos.

No **Capítulo 2** são apresentados os fundamentos teóricos. Apresenta-se uma revisão bibliográfica sobre a estrutura das peles, assim como as etapas do processamento do couro. Também é descrita a biodeterioração do couro e estágios de tratamento da pele ou couro suscetíveis ao ataque de bactérias e fungos e as consequências danosas que estes

microrganismos causam ao couro. Os microbicidas sintéticos aplicados na indústria coureira, também são descritos neste capítulo.

No **Capítulo 3** faz-se uma descrição das etapas envolvidas na realização dos experimentos. São apresentados os materiais e as formulações utilizadas nos ensaios e, por fim, os métodos de análises para avaliar o desempenho dos microbicidas.

Após o procedimento experimental, o **Capítulo 4** apresenta os resultados obtidos. Neste Capítulo faz-se ainda a discussão dos resultados dos ensaios.

No **Capítulo 5** é apresentada uma síntese das principais conclusões resultantes do trabalho experimental realizado no domínio desta dissertação, seguido de sugestões para trabalho futuro.

Capítulo 2

Revisão bibliográfica

Neste capítulo será apresentada uma base teórica e uma revisão bibliográfica, primeiramente sobre a constituição da pele, seguida das etapas do processamento do couro. Em seguida é mostrada a teoria da biodeterioração do couro e estágios suscetíveis ao ataque de bactérias e fungos, bem como as consequências danosas que estes microrganismos causam ao material. Por fim, serão abordados os microbicidas sintéticos e naturais aplicados na indústria coureira.

2.1 Estruturas da pele

As peles constituem a matéria-prima da indústria do couro e representam cerca de 7 % em peso do corpo animal. Possuem, além da função de recobrimento do corpo (carcaça), também as funções de regular e manter constante a temperatura do organismo que protege, eliminar produtos do metabolismo, armazenar substâncias graxas e exercer ação protetora contra a ação de bactérias e demais agentes agressivos do meio em que vive o animal (GUTTERRES, 2013).

As diferentes funções da pele podem ser realizadas devido à multiplicidade de tecidos que compõem a sua estrutura. O tecido muscular é responsável pelos movimentos da pele. O tecido nervoso detecta e responde aos estímulos externos. O tecido adiposo produz e acumula lipídeos. O tecido glandular atua na eliminação de resíduos do metabolismo e secreção de

substâncias durante a vida do animal. Já, o tecido conectivo serve de suporte para os outros tecidos, enquanto que o tecido epidérmico protege as camadas subjacentes da pele.

Há peculiaridades fundamentais na constituição e formação da pele como espessura, comprimento, largura, estrutura fibrosa, desenho de superfície e propriedades físicas. Estas variam de acordo com as raças, espécies, idade e hábitos alimentares do animal. Porém, pode-se afirmar que existem mais semelhanças que diferenças entre as peles animais, pois as estruturas de proteínas como queratina, colágeno e elastina são as mesmas para uma espécie. (HEIDEMANN, 1993; GUTTERRES, 2013).

O sistema dérmico dos mamíferos exibe uma complexa estrutura morfológica que é formada basicamente por três camadas: a camada superior (externa), chamada de epiderme, a camada intermediária, derme ou *córium* (cútis) e a camada inferior (subcutânea) que é a hipoderme.

A pele recém-retirada do animal (esfola) é constituída basicamente de água, sais minerais, gordura natural e material proteico, além de baixas quantidades de pigmentos e carboidratos. Um esquema ilustrativo é apresentado na Figura 2.1, onde é possível observar um desenho esquemático que mostra as três camadas formadoras da pele: epiderme, derme e hipoderme.

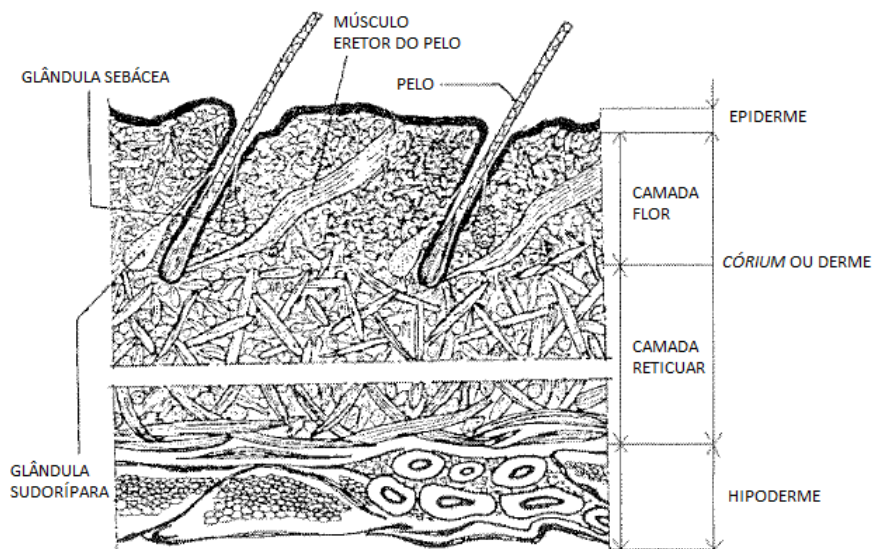


Figura 2.1: Estrutura da pele bovina
Fonte: ADZET, 2010

Epiderme

A epiderme constitui a camada mais fina e externa da pele, apresenta-se como um conjunto de células em camadas sobrepostas, representa 1 % da espessura total e possui como função principal a proteção do organismo contra agentes externos nocivos (HOINACKI, 1994; HERFELD, 1990).

Quimicamente a epiderme é constituída basicamente por um grupo de proteínas conhecido como queratina, além de melanócitos e células de imunização. Anexos cutâneos como pelos, folículo piloso, glândulas sebáceas e sudoríparas, também estão presentes na epiderme dos mamíferos, estendendo-se até a derme. A junção entre epiderme e derme tem a forma de papilas, que conferem maior superfície de contato e facilitam a difusão de nutrientes, além de darem resistência ao atrito da pele (HEIDEMANN, 1993).

Derme ou Córium

A derme é constituída por um tecido resistente, flexível, elástico e extraordinariamente firme de finas fibras entrelaçadas. É a camada de interesse para os curtumes, compõe a camada intermediária, mais espessa da pele, contribuindo com 85 % da espessura total. A derme é composta por duas camadas denominadas papilar e reticular. A superior, denominada camada papilar ou camada flor, é constituída de fibras de colágeno finamente entrelaçadas e fibras de elastina bem orientadas além de conter vários elementos, como fibroblastos, glândulas sebáceas e sudoríparas, músculo eretordo do pelo, raiz do pelo e vasos sanguíneos. A camada reticular é formada por grossas fibras de colágeno orientadas em todos os sentidos e direções (GUTTERRES, 2008; ADZET, 2010).

Hipoderme

A hipoderme é a camada mais interna, é um meio de união da pele com os tecidos e órgãos que recobre e ocupa cerca de 14 % da espessura total. É o tecido subcutâneo, junto ao qual se encontram tecido adiposo, conectivo, vasos sanguíneos, nervos e músculos (GUTTERRES, 2008; ADZET, 2010).

A hipoderme faz parte do isolamento térmico e da proteção contra choques mecânicos, além de atuar como reservatório energético (HEIDEMANN, 1993).

2.1.1 Zonas da pele

A pele não apresenta a mesma uniformidade nas diferentes zonas que a constitui, a textura das fibras, a espessura e outras características variam de acordo com a região da pele.

A Figura 2.2 mostra um desenho esquemático, ilustrando as zonas da pele. O grupão é a parte mais homogênea e mais resistente, rica em substância dérmica, sendo, portanto, a mais nobre. Os flancos possuem menor espessura e são menos firmes.

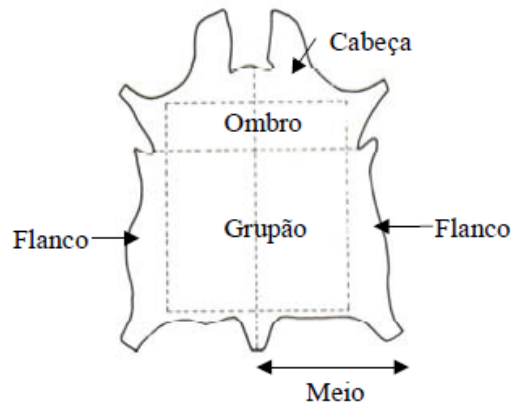


Figura 2.2: Zonas da pele

2.1.2 O colágeno

A proteína de colágeno é a principal substância constituinte da pele. Representa um terço do total de proteínas dos mamíferos. São conhecidos aproximadamente 27 tipos diferentes de colágenos (ADZET, 2010).

A estrutura do colágeno é constituída por uma sequência repetitiva de três resíduos de aminoácidos por passo, conhecido como tripleto Gly-X-Y. Onde Gly é a glicina e as posições X e Y são, preferencialmente, ocupadas por prolina e hidroxiprolina, respectivamente.

A variedade de colágeno é função da combinação de domínios em hélice tripla com domínios não helicoidais, como mostra a Figura 2.3.

O colágeno, que é uma proteína fibrosa, possui um nível elevado de organização estrutural, com um arranjo de feixe de fibras. As proteínas fibrosas geralmente são adaptadas às suas funções biológicas e na estrutura que apresentam, elas têm propriedades que conferem flexibilidade e/ou resistência, tendo como principais características a grande resistência ao rasgamento e alta capacidade de absorção de água (HOINACKI, 1994; ADZET, 2010; GUTTERRES, 2004).

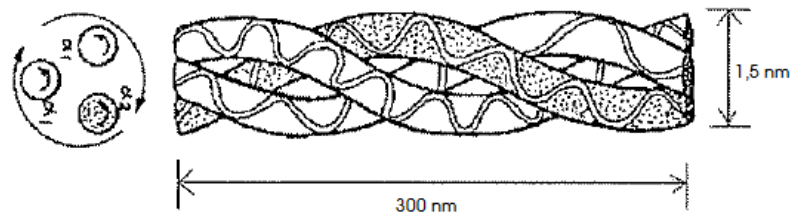


Figura 2.3: Tripla hélice da molécula de colágeno
Fonte: ADZET, 2010

2.2 Processamento do couro

O couro é definido como um material produzido a partir da pele de animais vertebrados, por processos que a torna imputrescível sob condições quentes e úmidas.

O processo de transformação de peles em couro implica a passagem das mesmas por uma série de etapas ou operações, normalmente agrupadas em três fases principais, conhecidas por ribeira, curtimento e acabamento.

A seguir serão apresentadas, sucintamente, as diferentes etapas do processo realizado hoje na indústria curtidora, pelas quais as peles são submetidas até sua transformação em couro acabado. Os textos a seguir são baseados em GUTTERRES, 2013.

2.2.1 Ribeira

Esta fase constitui-se de processos mecânicos e químicos que têm por finalidade efetuar a limpeza na pele, eliminando substâncias que não irão constituir o produto final, que são a epiderme, a hipoderme e o material interfibrilar, bem como preparar sua matriz de fibras colagênicas (estrutura protéica a ser mantida), para reagir adequadamente com os produtos químicos das etapas seguintes, tornando acessíveis os sítios de reação para o curtimento. Esta fase é constituída pelas etapas de conservação, pré-remolho, pré-descarne, remolho, depilação e caleiro, descarne, divisão, desencalagem, purga e píquel.

Conservação

A fim de permitir o transporte e armazenamento das peles, evitando que estas entrem em decomposição, as mesmas passam por processos de conservação.

Os processos utilizados para conservação ou promovem a desidratação da pele ou são baseados na ação bactericida de determinados produtos, visando criar condições que impossibilitam o desenvolvimento de bactérias e a ação enzimática. Os principais processos de conservação são a salga e a secagem.

Batedor de sal e Pré-remolho

As peles conservadas por salga passam por um processo prévio a seco de remoção (batimento) do excesso de sal realizada em um fulão aberto com ripas de madeira e seguindo para um fulão fechado de pré-remolho (com água), visando à lavagem superficial das peles e favorecer o seu manuseio na máquina de descarnar.

Pré-descarne

O pré-descarne é uma operação mecânica, realizada em máquina de descarnar que tem por finalidade a prévia eliminação dos materiais aderidos ao carnal, que são restos de carne e tecido adiposo e permitindo a penetração rápida e uniforme dos produtos químicos.

Remolho

O principal objetivo neste processo é interromper a conservação da pele e fazê-la retornar, o máximo possível, ao estado de pele fresca, repondo às peles o teor de água que estas perderam durante o processo de conservação (reidratação das peles) e remover o sal, no caso de peles salgadas.

O remolho tem ainda por finalidade a limpeza de peles através da ação da água, ácidos, enzimas, álcalis e tensoativos, com o objetivo de extrair as proteínas globulares; retirar os produtos químicos adicionados durante a conservação; remover sangue, sujidades e excrementos que podem estar aderidos, preparando as peles adequadamente para as operações e processos seguintes.

Depilação e caleiro

Na depilação, a camada epidérmica da pele, juntamente com pelo ou lã e demais materiais queratinosos, são removidos pela adição de sulfetos, aminas e/ou enzimas. No processo de caleiro é empregada a cal que provoca o inchamento osmótico das peles que favorece a abertura e limpeza entre as fibras, e facilita os processos mecânicos posteriores de descarne e divisão.

Descarne e divisão

Após o caleiro, com as peles em estado de inchamento e intumescimento, é realizado o descarne em máquina de descarnar que tem por objetivo remover os resíduos de gordura e apêndices que ainda estiverem aderidos à estrutura, facilitando a penetração dos produtos químicos aplicados em etapas posteriores.

Em seguida ao descarne, as peles são submetidas à outra operação mecânica chamada de divisão, onde passam através de uma lâmina que corta a pele transversalmente ajustando sua espessura e dando origem a duas camadas: a camada superior, conhecida como flor e a camada inferior conhecida como raspa.

A flor é calibrada em sua espessura de acordo com o artigo que será produzido, enquanto que a raspa é retirada como um produto secundário.

Desencalagem

É um processo químico que visa remover o hidróxido de cálcio incorporado à pele na etapa de caleiro, tanto a quantidade que está quimicamente combinada, quanto a que não está ligada à estrutura. A cal é eliminada com produtos que solubilizam o cálcio: ácidos orgânicos fracos, sais de amônio ou sais ácidos. Permite assim, que a pele desinche e ajusta o pH para a purga.

Purga

A purga tem por finalidade uma limpeza da profunda estrutura fibrosa removendo restos de queratina e lipídeos.

É um tratamento enzimático de proteólise (quebra de proteínas que levam à liberação de peptídeos menores) de resíduos de pele. As enzimas atuam sobre os materiais queratinosos degradados, restos de epiderme, gorduras e material interfibrilar, para dar origem a uma flor mais fina e toque suave.

Píquel

Constitui a última etapa de ribeira, tem por objetivo interromper a ação da purga e preparar as fibras de colágeno para fácil penetração do agente curtente. As peles são tratadas com ácidos orgânicos e inorgânicos que ionizam ou mascaram os grupos carboxílicos das peles permitindo a penetração dos agentes curtentes minerais.

As peles piqueladas não sofrem ataque bacteriano devido ao seu pH baixo e à alta concentração de sal, porém, deve-se ter cuidado com o desenvolvimento de fungos, utilizando para isto microbicidas apropriados.

2.2.2 Curtimento

Nesta etapa, ocorre a verdadeira transformação das peles, pré-tratadas na ribeira, em material imputrescível, dotado de estabilidade química, térmica e mecânica, ou seja, a transformação das peles em couros.

A reticulação das cadeias do colágeno por ação dos agentes curtentes confere características importantes ao couro, como aumento na temperatura de retração, aumento da espessura do couro e resistência ao ataque de microrganismos e enzimas.

Os principais produtos utilizados no curtimento são os sais de cromo e os taninos vegetais, sendo que a maioria das peles produzidas no Brasil e no mundo são curtidas com sais de cromo, dando origem ao couro denominado wet-blue, devido à sua coloração azulada e ao teor de umidade.

A indústria coureira existe há aproximadamente 4000 anos. Até o final do século XIX, as opções eram limitadas ao curtimento com alumínio, vegetal, com óleo e fumaça.

Curtimento mineral

Apesar da existência de sistemas de curtimento alternativos, o processo de curtimento mineral com sais de cromo continua sendo utilizado em larga escala pela grande maioria dos curtumes em todo o mundo. O curtimento ao cromo é baseado na formação de um complexo binuclear de cromo ligado aos grupos carboxílicos dos ácidos aspártico e glutâmico da estrutura de colágeno.

As peles piqueladas ao entrarem no banho de curtimento apresentam pH em torno de 3, de forma que a taxa de reação entre a proteína e o cromo é baixa. Esta condição permite que o sulfato básico de cromo penetre na matriz colagênica sem que haja deposição sobre a superfície. Após a difusão do cromo através de toda a espessura do couro, inicia-se a

basificação, que promove a fixação do cromo à fibra, realizada pela adição de produtos alcalinos como óxido de magnésio, bicarbonato de sódio, dolomita ou outros produtos, elevando o pH da pele e do banho.

As principais variáveis de processo que podem influenciar na absorção de cromo pela pele são: (a) ação mecânica: a reação química entre o curtente e o substrato depende da ação mecânica a qual depende da velocidade de rotação do fulão, carga e volume do banho; (b) temperatura: a reação entre o cromo e o colágeno é um processo controlado pela cinética, a temperatura altera a taxa com que o cromo é fixado ao colágeno, uma temperatura mais alta acarreta numa reação mais rápida entre o cromo e o colágeno. (c) pH: banhos com pH mais altos resultam em maior quantidade de cromo fixado e conseqüentemente em temperatura de retração maior do couro, com um maior tempo de curtimento a quantidade de cromo fixado e a temperatura de retração aumentam.

Curtimento vegetal

O curtimento vegetal com taninos vegetais, substâncias estas de grande complexidade e estruturas diversas, é, de modo geral, usado para obtenção de couros pesados. O material tanante é um produto natural, encontrado em vários tipos de plantas. É extraído das cascas, lenho, ou frutas de plantas como acácia, quebracho e castanheiro. Por extração com água e posterior concentração, se obtém os extratos curtentes vegetais cujas características dependem do vegetal de que procedem.

O processo de curtimento ocorre em dois estágios. Inicialmente, as moléculas de tanino difundem para o interior da pele para sítios onde elas, em segundo estágio, são finalmente fixadas durante a fase de fixação.

Alguns fatores como tamanho da partícula, pH, temperatura, viscosidade da solução, concentração, ação mecânica, uso de reagentes para promover a fixação, entre outros, podem influenciar na difusão e na fixação do material tanante.

O componente fundamental dos extratos curtentes são os taninos, cuja característica principal é a transformação das peles em couros. Os taninos são compostos de caráter fenólico, que segundo a sua procedência podem ter diversas estruturas e composições.

As plantas contem diversos tipos de moléculas fenólicas, as quais para que possam atuar como agentes curtentes devem alcançar um tamanho mínimo para obter certa reatividade.

Uma das propriedades características dos taninos é a sua multifuncionalidade que os permite reagir ao mesmo tempo com vários grupos reativos do colágeno.

A ligação de taninos vegetais com as cadeias de colágeno ocorre por ligações de hidrogênio entre grupos fenólicos de taninos e grupos carbonamidas da cadeia de colágeno, proporcionando uma alta estabilidade à estrutura de colágeno.

2.2.3 Acabamento

O acabamento consiste nas etapas de acabamento molhado, pré-acabamento e acabamento final.

Acabamento molhado

O acabamento molhado compreende uma série de etapas entre elas, neutralização, recurtimento, tingimento e engraxe, onde os couros são tratados com diversos tipos de produtos químicos, buscando-se nestas operações definir algumas propriedades físicas e mecânicas desejáveis no couro como, resistência à tração, maciez, elasticidade, enchimento, toque, firmeza, cor, lisura da flor e impermeabilidade.

Neutralização

Compreende a primeira etapa do acabamento molhado. Tem por finalidade ajustar o pH, eliminando o excesso de acidez dos couros curtidos com sais de cromo para que haja compatibilidade entre a carga do substrato (couro) e os produtos de caráter aniônico, como recurtes, corantes e agentes de engraxe.

Recurtimento/enchimento

O recurtimento consiste na penetração de substâncias recurtes, que ocorre por gradiente de concentração e por ação mecânica, estas vão se ligar na estrutura de colágeno, fechando a estrutura e dando enchimento à mesma, servindo como base para as operações de tingimento e engraxe. Nesta operação são definidas as principais características do artigo final com melhora de algumas propriedades mecânicas, de enchimento, textura e maciez.

Os produtos aplicados no recurtimento vão desde recurtes minerais como sais de cromo, alumínio e zircônio, a recurtes vegetais, como extratos de acácia, quebracho e castanheiro, passando por recurtes poliméricos e aldeídos.

Tingimento

O tingimento é uma operação que depende fundamentalmente das etapas anteriores. Nesta etapa são empregados corantes e auxiliares de dispersão a fim de melhorar o aspecto e conferir cor ao couro.

Além da cor adequada, é importante que o couro apresente a penetração do corante em toda a sua espessura, uniformidade, resistência à luz, à água e à fricção.

Alguns fatores como volume do banho, temperatura, tipo de corante, dimensões do fulão e tipo de curtimento devem ser considerados para uma maior eficiência do tingimento.

Engraxe

A principal finalidade do engraxe é conferir a maciez necessária ao couro, envolvendo as fibras de colágeno com material lubrificante, impedindo a aglutinação das mesmas durante o processo de secagem; garantindo boa resistência mecânica, elasticidade e flexibilidade do couro. Os produtos de engraxe podem ser de origem animal, vegetal ou mineral.

Pré-acabamento

Esta etapa compreende as operações de secagem, acondicionamento, amaciamento e lixamento que visam à preparação do couro para o acabamento final.

Secagem

É a etapa do processamento do couro que visa eliminar água, reduzindo o teor de 55 % para valores em torno de 14 %. Existem vários tipos de secagem como sistemas a vácuo, ao ar livre e estufas com circulação de ar. Na secagem, devido à retirada da água e conseqüente aproximação das fibras, a reticulação entre o colágeno, curtentes e produtos envolvidos no processamento do couro é concluída.

Amaciamento

O amaciamento tem por finalidade conferir ao couro reumedecido melhor flexibilidade e maciez. É realizado por máquinas que estiram as fibras e as estruturas como máquina de amaciar com sistemas de pinos, máquina de amaciar com braço mecânico e fulão de bater, fazendo com que os feixes de fibras internas percam o estado de aglutinação.

Lixamento e Desempenamento

Alguns couros são submetidos ao lixamento para remover a parte superficial da camada flor, a fim de efetuar uma correção com a atenuação de defeitos, equalizando a sua superfície. O pó gerado é removido em máquinas de desempear com escova ou por meio de sucção.

Acabamento final

O acabamento final constitui a última etapa do processamento. Tem como objetivo conferir ao couro semi-acabado melhor apresentação e aspecto final definitivo. É aplicado sobre a camada flor do couro, com uso de pistolas pneumáticas ou com equipamento especial como rolo de tinta. Os tratamentos aplicados no acabamento final, são: de impregnação para fixar a epiderme na derme do couro, com o uso de resinas; aplicação de fundo e cobertura, utilizam-se corantes, resinas e auxiliares de penetração, com o objetivo de igualar a cor e cobrir defeitos; fixação, última camada aplicada na etapa de acabamento final, confere resistência à abrasão, toque e tipo de brilho ao couro acabado.

Os processos mecânicos aplicados ao acabamento são de prensagem, estampagem e de polimento.

2.3 Biodeterioração do couro

A biodeterioração é um fator prejudicial às propriedades estéticas e funcionais de materiais orgânicos como o couro e produtos feitos a partir dele. As peles além de possuírem alta umidade, são ricas em gorduras e proteínas, que servem como substratos para o desenvolvimento de microrganismos, especialmente bactérias e fungos. Estes microrganismos usam os nutrientes presentes nas peles como fonte de alimentação e produção de energia e são capazes de contaminar as peles desde o abate (esfola) até o couro já processado (BRYANT *et al.*, 2011; ORLITA, 2004).

Além das fontes nutricionais presentes na pele, algumas substâncias utilizadas no processamento do couro como óleos, graxas e ligantes protéicos também favorecem o crescimento microbiano.

Depois da esfola, as peles frescas ou verdes são atacadas por bactérias, o que pode levar a sua decomposição total pelas enzimas microbianas que só é interrompida mediante o uso de conservantes. À medida que as peles são processadas, a presença de bactérias cede lugar a

outro grupo de microrganismos, os fungos. A Figura 2.4 apresenta a tecnologia da produção do couro relacionada com os principais microrganismos causadores de danos nas etapas do processo.

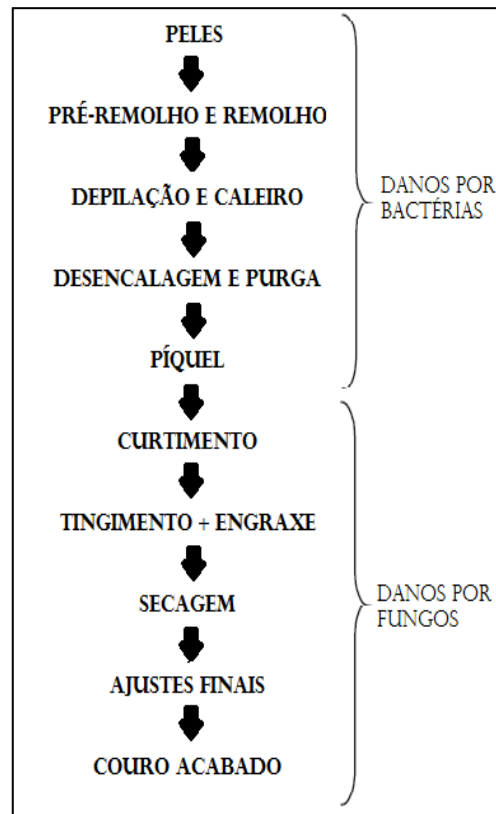


Figura 2.4: Etapas de processamento do couro suscetíveis a ataques por bactérias e fungos
Fonte: ORLITA, 2004

2.3.1 Microrganismos deteriorantes e mecanismo de ação

Os principais microrganismos que atacam peles e couros ocasionando a sua deterioração são os fungos e as bactérias.

Bactérias

Bactérias são organismos procariotos de célula única, que absorvem seus nutrientes por difusão simples, suas dimensões em geral variam de 0,5 a 3,0 μm de diâmetro. As espécies pertencentes a este grupo podem apresentar diversos formatos, como esféricos, cilíndricos, espiralados, entre outros. Multiplicam-se predominantemente por fissão binária. Quanto à sua nutrição, são capazes de utilizar compostos orgânicos ou inorgânicos como fonte de carbono e energia (PELCZAR *et al.*, 1996; TOUMELA *et al.*, 2000). De acordo com seu modo de respiração, elas podem ser classificadas como aeróbias ou anaeróbias. As bactérias anaeróbias

podem ser facultativas ou obrigatórias (ou estritas). As bactérias anaeróbias facultativas são assim classificadas devido à capacidade que possuem de realizar respiração aeróbia quando o ambiente fornecer oxigênio e anaeróbia, na falta deste elemento químico (TORTORA, 2005).

As células procarióticas desenvolvem-se na presença de matéria orgânica e pequena quantidade de água e nutrientes. A velocidade de crescimento depende da temperatura e do pH do meio. As condições ideais para o crescimento das bactérias deteriorantes giram em torno do pH neutro a suavemente alcalino. As bactérias podem ser encontradas nos mais diversos ambientes e são responsáveis pela deterioração de matéria orgânica (VERMELHO *et al.*, 2006).

Fungos

Os fungos são organismos desprovidos de clorofila, por isso são incapazes de utilizar diretamente a energia da luz, necessitando de fontes externas de nutrientes para sobrevivência e crescimento. Sua nutrição é feita por absorção de moléculas orgânicas, graças à produção de enzimas que são produzidas por eles e utilizadas para a degradação dos nutrientes. Usualmente são multicelulares e apresentam um processo de multiplicação mais complicado que as bactérias (GUTHEIL, 1975; LOPES, 1988; MUELLER & SCHMIT, 2007).

São formadores de filamentos ramificados, denominados hifas. Algumas destinam-se à absorção de substâncias nutritivas; penetram nos meios e são denominadas hifas vegetativas. Outras produzem esporos, conhecidas por hifas de reprodução; estas emergem da superfície e formam o micélio aéreo, que sustenta as estruturas que contêm os esporos de reprodução. O conjunto de hifas chamado de micélio pode ser visível a olho nu, sob a forma de penugem, feltro fino, algodão ou teia de aranha, com coloração variada (MUELLER & SCHMIT, 2007).

A reprodução de fungos realiza-se, geralmente, por meio de esporos, produzidos em grande número. São facilmente dispersos por corrente de ar. Podem permanecer em suspensão por longo tempo, sendo transportados por consideráveis distâncias, podendo sobreviver na forma seca, desenvolvendo-se no momento que encontrar condições adequadas. Partículas de solo constituem outro meio fácil de dispersão dos esporos. Por este motivo, os esporos são achados em grandes quantidades em quase todos os lugares (TORTORA, 2005).

As bactérias e fungos estão presentes em praticamente todos os ambientes, são importantes para vários segmentos de mercado, indo desde a alimentação humana até a produção de medicamentos. Porém estes microrganismos acarretam sérios problemas para a

indústria coureira, devido à facilidade e velocidade do seu desenvolvimento, deteriorando peles e couros.

2.3.2 Ataque bacteriano às peles

Na indústria do couro um dos problemas mais importante encontrado é conservar a pele verde ou fresca após o abate do animal. As peles podem ser facilmente contaminadas pelas bactérias encontradas no ar, no solo e na água, pois contêm grandes quantidades de proteínas, gorduras, além de ser fonte de carbono, oxigênio e nitrogênio (ORLITA, 2004).

Existem mais de 80 tipos de bactérias aeróbicas e anaeróbicas que podem putrefazer peles e couros. As principais espécies encontradas na ribeira são:

- *Bacillus subtilis*;
- *Escherichia coli*;
- *Micrococcus* spp.;
- *Proteus vulgari*;
- *Pseudomonas aeruginosa*;
- *Streptomyces* sp..

A Figura 2.5 apresenta amostras de peles remolhas contaminadas com bactérias.

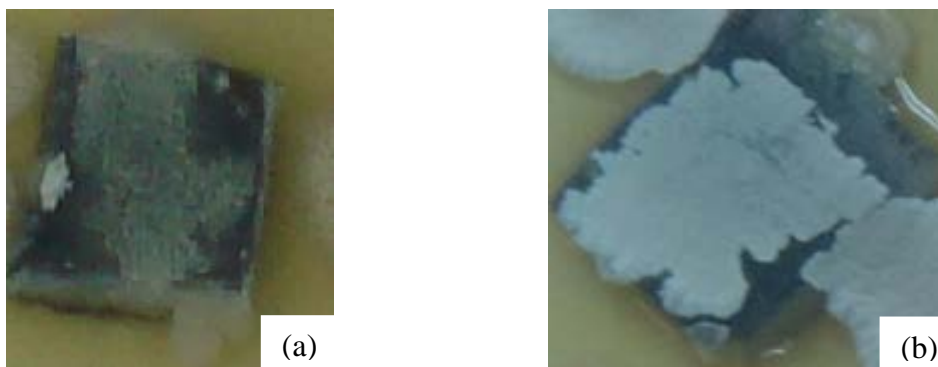


Figura 2.5: Amostras de peles remolhas contaminadas com (a) *Bacillus subtilis*, (b) *Streptomyces* sp.
Fonte: O AUTOR

2.3.2.1 Etapas suscetíveis ao ataque bacteriano

Peles verdes

As peles iniciam o desenvolvimento bacteriano logo após o abate devido à presença de resíduos de sangue e excrementos. Este processo de decomposição e ataque bacteriano é somente interrompido ao fazer a preservação ou conservação das mesmas por meio de produtos químicos específicos, refrigeração, salga ou secagem.

O método mais usado para a conservação de tripas é a salga, que se baseia no efeito de desidratação promovido pelo cloreto de sódio. Uma das principais desvantagens da salga é a elevada poluição causada pelos sólidos dissolvidos no efluente, além do que o próprio sal de origem marinha normalmente já contém algumas bactérias conhecidas como bactérias halófilas que não só são tolerantes ao sal, como também, necessitam de altas concentrações deste para sobreviver (REGGI, 1996).

As bactérias atacam as proteínas presentes nas peles, degradando-as por estágios, em produtos sucessivamente mais simples: proteoses, peptonas, polipeptídios, peptídeos e aminoácidos, que são decompostos em aminas, ácidos orgânicos, alcoóis e hidrocarbonetos. Alguns destes compostos podem ainda ser desdobrados em ácidos mais simples, hidrogênio, dióxido de carbono e amônia. Estes compostos podem ser absorvidos através das membranas celulares das bactérias e geralmente servem como nutrientes. A decomposição das proteínas está geralmente associada à liberação de compostos de odor desagradável (indol, escatol, sulfeto de hidrogênio, mercaptanos, etc.), perda de peso e perda de resistência por parte do couro. Os pelos ficam opacos, perdem o brilho, e com o evoluir do processo, tornam-se frouxos ou mesmo se desprendem completamente, a derme se torna gomosa e as pilhas de peles verdes aquecem (GUTHEIL, 1975).

De acordo com GUTTERRES (2013), no processo de putrefação, as bactérias penetram na pele pelo lado carnal e em um período de 4 horas pós-morte só se encontram sobre o lado do carnal, entre 8 a 12 horas já se encontram bactérias no *córium* e em 24 horas está contaminada toda a espessura da pele. Em 48 horas já é possível observar-se um afrouxamento do pelo.

O processo de autólise consiste na degradação dos componentes da pele causada por enzimas presentes na mesma, após a morte do animal.

Durante a vida do animal essas enzimas desempenham um papel importante, pois auxiliam no metabolismo e na síntese proteica, sendo reguladas pelo próprio organismo. Mas,

assim que o animal é abatido, a auto-regulação destas enzimas termina e as mesmas passam a hidrolisar proteínas, carboidratos e lipídios de maneira descontrolada, favorecendo o ataque bacteriano, tornando possível o desenvolvimento de bactérias que não atuam diretamente sobre as substâncias dérmicas, mas sobre produtos de seu desdobramento.

Remolho

Durante o processo de remolho, as bactérias multiplicam-se muito rapidamente, pois se encontram em meio neutro na pele, favorável para seu desenvolvimento. Atingem valores de milhares de colônias por mililitro de água de remolho, passando a atacar as proteínas das peles, liberando enzimas que a degradam, causando danos consideráveis a constituição fibrosa devido à decomposição da substância dérmica (MUTHUSUBRAMANIAN *et al.*, 2006; REGGI, 1996; GRIEBEL, 1997).

O número de bactérias presentes no banho de remolho aumenta lentamente no início do processo, esta fase é denominada de “período latente do crescimento”, conforme mostra a Figura 2.6.

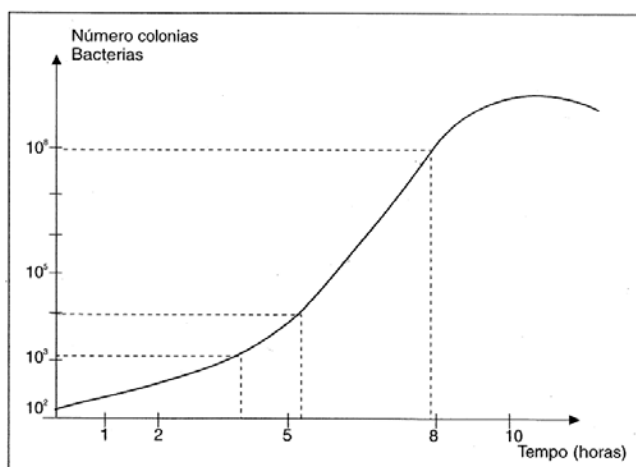


Figura 2.6: Curva típica do desenvolvimento de bactérias em remolho sem conservante
Fonte: GRIEBEL, 1997

A duração do “período latente” varia com as condições do reverdecimento ou remolho e com a natureza das peles. No remolho, realizado em temperatura compreendida entre 10 e 20°C, o período latente é de 8 a 36 horas e quando a duração do tratamento de remolho não ultrapassa o período de crescimento das bactérias, a perda de substância proteica da pele é mínima. Se a proliferação das bactérias é intensa, aumenta consideravelmente a quantidade de enzimas por elas elaboradas e difundidas para o banho de remolho, podendo causar danos irreversíveis ao couro (GUTHEIL, 1975).

A maior parte dos curtidores prefere remolhar as peles conservadas com sal por curtos períodos de tempo para minimizar os defeitos, mas isso nem sempre é viável. O tempo e as condições exigidas dependem do tipo e condição da pele conservada, das condições físicas da pele crua e das flutuações de operação de ribeira. O aumento de temperatura da água ajuda a dispersão das proteínas globulares e acelera o processo de remolho (KANAGARAJ *et al.*, 2005). Todas as variáveis expostas obrigam o curtidor atual a ser mais crítico sobre as operações de remolho, particularmente, para evitar perda de substância dérmica por danos causados pelas bactérias. Por isso, os agentes remolhantes, além de reidratar as fibras, dissolver sais e dispersar proteínas interfibrilares coaguladas, têm que inibir o crescimento de bactérias.

Como forma de evitar o ataque bacteriano, utilizam-se bactericidas em concentrações adequadas na conservação, cujo princípio ativo atua sobre estes microrganismos, para impedir qualquer dano bacteriano anterior ou posterior, durante a operação de remolho (FLORES *et al.*, 2002; ATC, 2007; REGGI, 1996).

Se o processo de conservação da pele não for bem executado, mesmo depois do couro curtido e acabado, poderão aparecer algumas evidências da presença de desenvolvimento bacteriano (GUTHEIL, 1975; BAYRAMOGLÜ, 2006; HOINACKI *et al.*, 1978):

Aquecimento das peles e couros em pilhas: a ação hidrolítica das enzimas bacterianas sobre fibras pode determinar um aquecimento, especialmente em couros mal conservados e colocados em pilhas muito altas ou de base muito grande.

Manchas vermelhas: é frequente o aparecimento de manchas vermelhas no carnal, principalmente onde há acesso de ar. Períodos quentes favorecem o desenvolvimento das manchas, que tem como causa o desenvolvimento de bactérias halófilas. Nas peles com vermelhidão, o ataque se verifica principalmente sobre a epiderme, que geralmente é afrouxada e danificada. Muitos pontos da flor se mostram atacados, mesmo quando não tenha ocorrido afrouxamento dos pelos.

Manchas de ácidos graxos: entre as bactérias com elevadas tolerância ao sal, algumas atuam sobre as gorduras, por meio de enzimas. A lipase, enzima por elas secretadas, catalisa a hidrólise das gorduras, resultando em ácidos graxos. Na operação de desencalagem das peles, os ácidos graxos reagem com o cálcio, formando sabões insolúveis. Estes impedem a combinação de taninos com as fibras de pele, resultando manchas no couro acabado.

Manchas violetas: são manchas de 1 a 2 mm, em grupos, no carnal e também no lado da flor. São causadas por bactérias produtoras de pigmentos corados e que crescem em presença de sal. Ocorrem com maior frequência em peles com maior teor de gordura.

Demarcação dos vasos sanguíneos, em forma de linhas afundadas, no lado da flor: este efeito é provocado pelo desenvolvimento de bactérias nos vasos sanguíneos, com ataque da derme em seu redor. A sangria incompleta do animal abatido é responsável pelo defeito, podendo ser diminuído por adequado curtimento.

Ataque por putrefação: o retardamento ou insuficiência no processo de conservação da pele verde, ou o armazenamento inadequado, pode causar uma degradação indesejada da pele, pela ação das enzimas das bactérias desenvolvidas. Geralmente o ataque começa no lado carnal, mas também a delicada camada flor é facilmente danificada resultando primeiramente, “flor cega” ou “fosca”. O ataque das enzimas faz perder o brilho natural da flor, inerente a trama de finas fibrilas de colágeno. Quando as enzimas enfraquecem as fibras da zona de ligação da camada da flor com a camada reticular, resulta “flor frouxa”. Trata-se de uma moderada putrefação. O afrouxamento dos pelos é também um processo de putrefação. As enzimas das bactérias afrouxam as ligações da epiderme e pelos com o resto da pele. Esta ação não é em si danosa. Atingido, porém este estágio, em pouco tempo, as bactérias iniciam o ataque das fibras da camada da flor, causando “vazios” na altura dos pelos, a flor fosca, ou danos de putrefação ainda mais sérios. A perda de substâncias da pele, por processo de putrefação, origina couro vazio ou esponjoso, com resistência diminuída (GUTHEIL, 1975; BAYRAMOGLÜ, 2006; HOINACKI *et al.*, 1978).

2.3.3 Ataque fúngico a peles e couros

As etapas de píquel, curtimento, tingimento e engraxe são suscetíveis ao desenvolvimento de fungos. O dano ao couro é causado pelo processo nutricional dos fungos.

Os fungos sintetizam enzimas e as lançam para o meio extracelular. Essas enzimas reagem com o couro hidrolisando gorduras, proteínas e carboidratos em estruturas menores, que são facilmente metabolizadas pelos fungos. As enzimas secretadas pelos fungos são responsáveis imediatos pelos danos causados ao couro e os produtos de decomposição podem originar efeitos secundários indesejáveis como presença de manchas permanentes e propriedades físico-mecânicas comprometidas devido à degradação do colágeno (CUADROS *et al.*, 2011; ZUGNO, 2011).

Na indústria coureira, os principais fungos que atacam o couro são:

- *Aspergillus niger*;
- *Penicillium chrysogenum*;
- *Aspergillus flavus*;
- *Rhizopus nigricans*;
- *Mucor mucedo*;
- *Trichoderma* sp;
- *Penicillium herguei*.

A Figura 2.7 mostra couros wet-blue e couros curtidos com tanino vegetal contaminados com (a) *Aspergillus niger*, (b) *Aspergillus flavus* (c) *Penicillium chrysogenum* (d) *Penicillium herguei*.

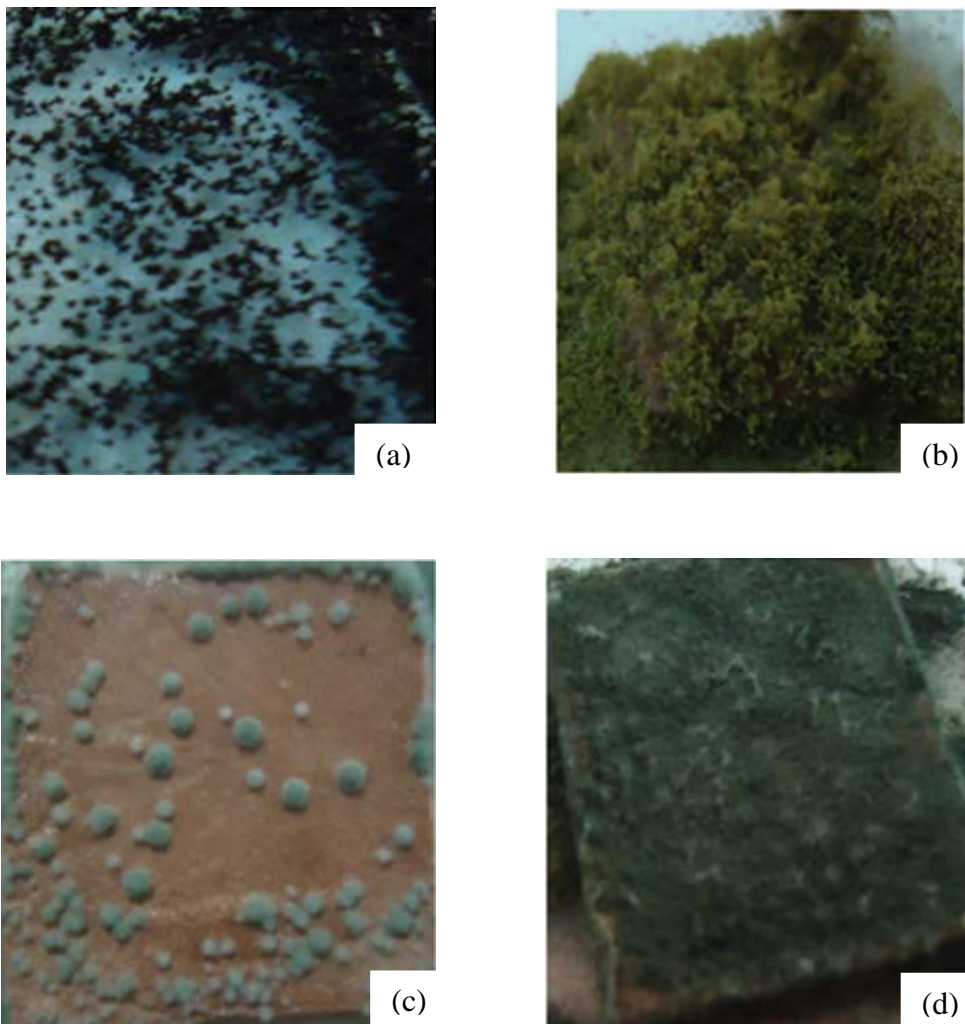


Figura 2.7: Amostras de couros contaminadas com (a) *Aspergillus niger*, (b) *Aspergillus flavus*, (c) *Penicillium chrysogenum*, (d) *Penicillium herguei*

Fonte: O AUTOR

2.3.3.1 Etapas suscetíveis ao ataque fúngico

Píquel

A partir do processo ácido-salino conhecido como píquel, as peles estão sujeitas ao crescimento de fungos. Mais suscetíveis são as peles piqueladas em banhos com o teor de sal menor que 5 % e de ácido sulfúrico menor que 0,15 %. Um píquel deficiente juntamente com um prolongado tempo de armazenamento em ambiente úmido e quente, favorece o desenvolvimento dos fungos nas peles. O uso de ácido no processo de piquelagem deve ser limitado, pois em elevadas concentrações, os mesmos, atacam as fibras da pele, diminuindo sua resistência ao rasgo e tornando-as amareladas, atacando o colágeno por lenta hidrólise ácida (GATIUS *et al.*, 2007).

Os fungos desenvolvem-se muito bem em meios ácidos e com elevado teor de umidade. A umidade associada com algumas substâncias higroscópicas como, açúcares, sais, albuminas e glicerinas propiciam o ataque deste microrganismo.

Curtimento

A contaminação de couros com fungos se realiza pelo ar, pela água, pelos banhos curtentes e em dependências infectadas.

As condições que propiciam o crescimento de fungos em couros são: o armazenamento de couros curtidos em locais úmidos e sem ventilação; o armazenamento de couros curtidos ao cromo em estado úmido nas pilhas ou cavaletes; nos couros engraxados onde os fungos atacam as gorduras, desdobrando-as em substâncias mais simples usadas para a sua nutrição; e, na secagem do couro ao tanino, devido ao seu elevado teor de umidade (GUTHEIL, 1975).

O curtimento ao tanino vegetal pode apresentar a presença de fungos no banho tanante, devido ao alto teor de matéria orgânica do mesmo. Este problema é descartado no curtimento mineral (ao cromo), pois é mínima a quantidade de matéria orgânica encontrada neste tipo de curtimento (VIDOTTO *et al.*, 2007).

Do ponto de vista nutricional, os fungos necessitam de uma fonte de carbono, extraída de matéria orgânica viva ou morta. Neste sentido, couros wet-blue e curtidos com extratos vegetais são considerados substratos adequados para o crescimento de fungos, uma vez que apresentam um pH levemente ácido (faixa de 3,5 – 5,0), alta umidade (cerca de 50 a 60 %) e presença de proteínas, carboidratos e gorduras (CÍTERA *et al.*, 2006; CUADROS *et al.*, 2011).

O crescimento fúngico em couros curtidos pode levar a uma variedade de defeitos indesejáveis no couro acabado, tais como descoloração, manchas brancas, negras ou coloridas em todo o couro ou em certas partes, manchas estas de difícil ou impossível remoção, liberação de ácidos graxos e diminuição de propriedades físico-mecânicas, que reduzem o valor do couro ou dos produtos com ele fabricado. Além das perdas financeiras (HAIBIN *et al.*, 2011), há também as perdas indiretas na forma de retrabalho e insatisfação dos clientes.

O crescimento de fungos em peles piqueladas ou após o curtimento impede um tingimento uniforme, causando diferenças de tonalidades da cor do couro acabado. Algumas partes podem revelar aspecto fosco, com aparência de manchas. O engraxe pode apresentar dificuldades, por falta de uniformidade na absorção dos óleos que se processa de modo diferente nas partes atingidas pelos fungos.

2.4 Microbicidas

Microbicida pode ser definido como qualquer substância química, sintética ou natural, que contém um ou mais agentes ativos, destinados a destruir, tornar inofensivo, evitar a ação ou exercer controle sobre quaisquer microrganismos considerados nocivos, agindo na conservação do material. A seleção de um microbicida adequado dependerá em primeiro lugar do material que irá proteger, do tipo de microrganismo que será controlado e também, do ambiente no qual o ingrediente ativo será utilizado.

Na indústria do couro, os microbicidas representam cerca de 15 % dos custos dos produtos químicos do processamento do couro (ADMINIS *et al.*, 2002). Os microbicidas podem ter ação específica sobre determinado tipo de microrganismo, como os bactericidas que agem contra o ataque de bactérias, e os fungicidas que conferem resistência a fungos, ou podem ter amplo espectro de ação, eliminando vários tipos de organismos indistintamente.

A escolha de um microbicida com ampla atividade se faz necessária quando o alvo é constituído por diferentes tipos de microrganismos. Em alguns casos, a associação sinérgica de diferentes princípios ativos apresenta ótima ação contra comunidades de microrganismos e/ou quando estes se tornam resistentes a tratamentos convencionais.

Os microrganismos encurtam a vida útil dos produtos industriais e naturais. Durante o processo de fabricação do couro, a efetiva proteção desse material, sensível em estado bruto e semi-processado, por conservantes químicos tornou-se cada vez mais importante. Nos últimos

anos, tem-se dado importância para a utilização de microbicidas seguros e para sua compatibilidade ecológica (MUTHUSUBRAMANIAN *et al.*, 2003; ADMINIS *et al.*, 2002).

Segundo HAUBER (2008), CUADROS *et al.* (2011) e BOTT (1992), a eficiência de um microbicida depende dos seguintes fatores:

- ótima atividade contra fungos e bactérias (baixa concentração inibitória mínima);
- compatibilidade com o couro e outros produtos químicos utilizados no processo (para aderir-se à superfície do couro curtido e não ter reatividade com outros produtos químicos);
- eficácia a variação de pH;
- estabilidade em relação à temperatura e a solubilidade;
- tamanho das partículas da emulsão (uma emulsão grosseira vai romper rapidamente, conferindo um baixo espalhamento);
- pouca toxicidade para outras formas de vida;
- biodegradabilidade (qualquer microbicida residual deve ser inofensivo para a atividade biológica após um dado tempo);
- segurança do ponto de vista da saúde, do manuseio e armazenamento;
- aceitabilidade do ponto de vista ambiental e econômico;
- não ser corrosivo para os materiais de construção dos equipamentos.

O uso efetivo do microbicida envolve a seleção do princípio ativo, a própria formulação, momentos e quantidades de adição na formulação dos banhos e condições de manuseio, embalagem ou armazenamento do couro.

Alguns fatores como teor de gordura, ainda presente na pele, temperatura, pH, presença de redutores, oxidantes ou outras substâncias adicionadas nos banho de remolho e curtimento podem interferir na eficácia do microbicida (ZUGNO, 2011).

No passado, a ação esperada dos conservantes era principalmente de fornecer uma proteção eficaz, mas em anos mais recentes, a preocupação com potenciais riscos ecológicos tornou-se relevante.

Na década de 70, os couros eram protegidos com substâncias químicas no controle de certos microrganismos que hoje são banidas, entre elas compostos que contêm mercúrio e clorofenatos.

Agentes conservantes a base de pentaclorofenol (PCP) foram largamente usados na indústria coureira, na prevenção da deterioração do couro por ataque microbiano, devido aos

seus excelentes efeitos bactericidas e fungicidas, bem como seu custo e eficácia. Devido à toxicidade do ativo e danos causados ao meio ambiente, seu uso e comercialização estão restritos (DALTON, 2012; MURALIDHARAN, 1994).

O pentaclorofenol é uma substância pouco biodegradável, que permanece na natureza por vários anos. Sua toxicidade não se deve apenas pelo próprio PCP, mas devido a substâncias presentes no produto, como o tetraclorodibenzodioxina (TCDD), composto considerado muito venenoso. Este tipo de conservante pode causar alergias e sérias doenças como leucemia ao entrar em contato com o sangue, por via oral ou através da pele (CUADROS *et al.*, 2011).

2.4.1 Composição de um microbicida

Um microbicida é composto basicamente por três elementos (RUIZ *et al.*, 2006):

- Ingrediente ativo: responsável pela ação microbicida do composto elaborado.
- Solventes: são substâncias utilizadas para emulsificar o princípio ativo. As principais substâncias utilizadas como solventes são: água, hidrocarbonetos e glicóis.

Estes meios aportam peculiaridade aos produtos que os tornam diferentes uns dos outros. Em geral os hidrocarbonetos são utilizados com a finalidade de baixar os custos, visto que requerem uma menor quantidade de emulsionantes. Os glicóis são mais estáveis e resultam em produtos de maior constância de qualidade, contudo de maior valor. O microbicida formulado a base de água encaixa-se como intermediário, pois é ambientalmente favorável e de custo interessante.

- Tensoativos: responsáveis pela perfeita emulsão do ingrediente ativo e do solvente, estabilidade do produto formulado, bem como a perfeita distribuição do princípio ativo durante a aplicação do mesmo no processamento do couro.

2.4.2 Ação e classificação dos microbicidas

A atividade antimicrobiana de diferentes agentes químicos é função de uma variedade de fatores extrínsecos (características químicas e físicas do ambiente situado em torno) e de fatores intrínsecos (natureza, estrutura e características dos microrganismos), sendo o conhecimento desses fatores indispensável para o sucesso da aplicação dos microbicidas (PENNA, 2005).

A reação dos agentes antimicrobianos com a célula microbiana envolve primeiramente uma ligação com a superfície da célula, mesmo que os locais ativos microbianos possam ser encontrados no interior da célula. Os alvos preferenciais dos microbicidas são os componentes celulares funcionais, encontrados principalmente no citoplasma, nos componentes da membrana citoplasmática e na parede celular. O acesso a estes componentes celulares é determinado pela composição química e propriedades físico-químicas que cada agente antimicrobiano apresenta, bem como pelas interações com o material extracelular, pela composição química e morfologia das células (DENYER *et al.*, 1998; PAULUS, 2005).

As Figuras 2.8 e 2.9 representam esquematicamente os potenciais alvos ativos dos microbicidas nas bactérias gram-positivas e gram-negativas e nos fungos, respectivamente.

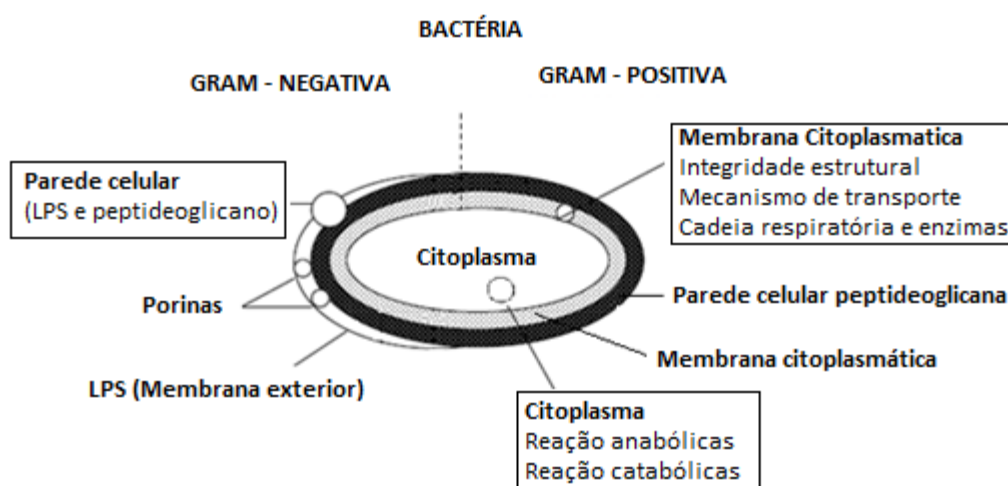


Figura 2.8: Representação esquemática dos potenciais alvos ativos dos microbicidas nas bactérias

Fonte: Adaptado de PAULUS, 2005

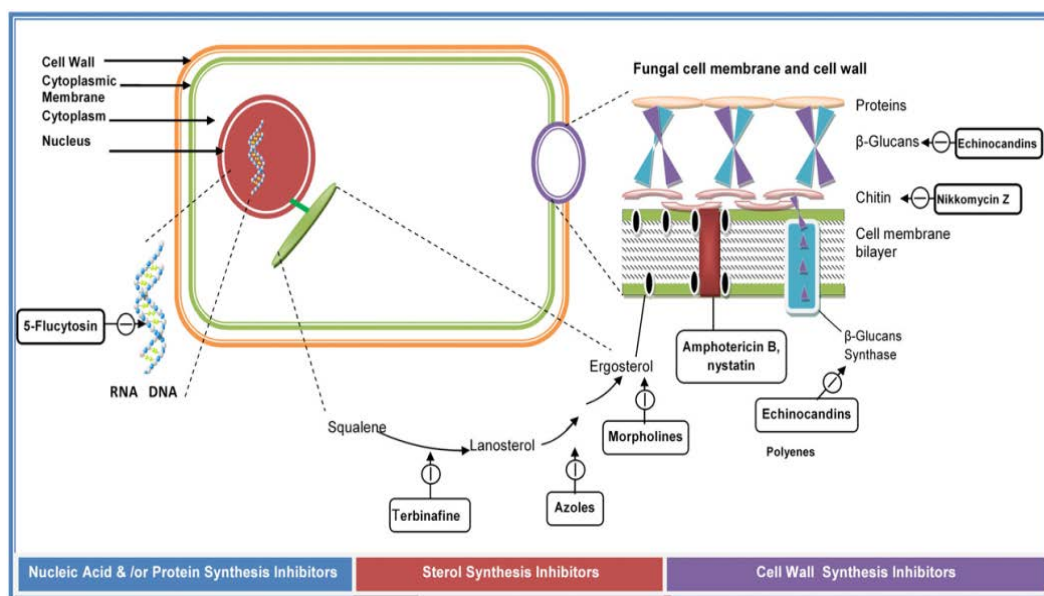


Figura 2.9: Representação esquemática dos potenciais alvos ativos dos microbicidas nos fungos

Fonte: KATHIRAVAN *et al.*, 2012

Segundo BURK (1984) e BOTT (1992), os microbicidas podem ser classificados de acordo com o seu caráter químico em microbicidas oxidantes e não oxidantes, como apresentado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Classificação de microbicidas de acordo com o caráter químico

Microbicidas não-oxidantes	Microbicidas oxidantes
Heterocíclicos	
Fenólicos	
Sais de cobre	
Compostos contendo mercúrio	
Aminas e compostos amoniacais	Compostos de cloro
Compostos organo-sulfurados	Compostos de bromo
Aldeídos	
Acroleína	
Tiocianatos	Compostos não halogenados
Azoles	
Compostos organo-bromicos	

Os microbicidas não oxidantes englobam uma série de compostos orgânicos e exercem sua atividade antimicrobiana atacando seletivamente alvos particulares dentro da célula, desintegrando a parede celular e/ou interferindo no metabolismo dos microrganismos.

Os microbicidas oxidantes têm atividade em relação a bactérias, fungos, algas e leveduras. Seu princípio de ação passa por oxidar compostos constituintes dos microrganismos, reagindo com a matéria orgânica presente no meio e assim diminuindo a concentração efetiva disponível para controlar os microrganismos, destruindo suas estruturas vitais e causando a sua morte. Até o momento, não há relato de desenvolvimento de resistência, por parte dos microrganismos, a microbicidas oxidantes.

Para obter-se o mesmo grau de efetividade, aplicam-se concentrações mais elevadas de microbicidas não oxidantes do que de microbicidas oxidantes, pois certos microrganismos desenvolvem tolerância a microbicidas não oxidantes, quando o tempo de contato é relativamente longo e as concentrações aplicadas são baixas, o próprio microbicida serve como fonte de carbono para os organismos.

2.4.3 Microbicidas aplicados na indústria do couro

Muitos dos agentes **bactericidas** anteriormente utilizados na conservação das peles eram baseados em compostos de mercúrio, fenóis clorados, mistura de ácido acético e sulfito. Estes compostos são muito eficazes, mas também são prejudiciais para o meio ambiente, não sendo mais usados para este fim. Os materiais substitutos disponíveis no mercado hoje são geralmente mais seguros. Os bactericidas mais comumente empregados no processo de remolho para a conservação de peles são o dimetilditiocarbamato de sódio que é um produto líquido, solúvel em água e que tem amplo espectro de atividade e o metiltiocianato de benzotiazol (TCMTB) (CÍTERA, 2006).

Para uma completa distribuição do produto na pele, é recomendado adicionar o microbicida junto à água de remolho antes de carregar as peles. A quantidade de produto a dosar depende do estado de conservação das peles, da temperatura e do tempo de processo.

Os **fungicidas** são utilizados na produção do couro para proteger os couros semi-processados (wet-blue e curtidos com extratos vegetais) e acabados contra o desenvolvimento de fungos, durante o armazenamento e o transporte, já que o couro contém nutrientes adequados e as condições ambientais na indústria são tipicamente favoráveis para o crescimento de fungos.

Estes produtos químicos, dosados normalmente junto ao píquel ou no próprio curtimento, são essenciais na fabricação do couro para garantir que a pele não seja afetada pelo crescimento de fungos e para certificar a qualidade do mesmo, evitando assim a degradação

do couro acabado com concomitante perda de valor comercial (ZUGNO *et al.*, 2010; DALTON, 2012). O uso adequado do microbicida é o primeiro requisito para a proteção do couro.

2.4.4 Principais microbicidas utilizados na indústria coureira

Atualmente o mercado oferece poucas substâncias ativas empregadas na indústria curtidora para o controle de bactérias e fungos, geralmente produtos sintéticos. Os microbicidas mais utilizados na indústria do couro recaem principalmente em duas famílias químicas (FONT *et al.*, 2011):

- Fenólicos: que incluem p-cloro-m-cresol (PCMC) e orto-fenilfenol (OPP); e,

- Heterocíclicos: que inclui o 2-(tiocianometiltio) benzotiazol (TCMTB), n-octilisotiazolinona (OIT) e o 2-mercaptobenzotiazol (MBT).

2.4.4.1 Microbicidas fenólicos sintéticos

Os microbicidas fenólicos sintéticos são formulados a partir das moléculas de orto-fenilfenol e para-cloro-meta-cresol, apresentando-se na forma de sais de sódio ou potássio em diferentes concentrações. São substâncias químicas totalmente miscíveis em água e não apresentam problemas de estabilidade química, apresentam boa absorção dos ingredientes ativos por parte dos couros e são estáveis a variações de pH. Oferecem amplo espectro de atividade bactericida e fungicida, podendo desta forma ser usados em todos os estágios da indústria coureira, indo desde a pele verde até o couro acabado.

De acordo com GRIEBEL (1997), no mecanismo de ação dos microbicidas fenólicos ocorre uma adsorção reversível das moléculas fenólicas na membrana citoplasmática dos microrganismos que inicialmente inibe o transporte de nutrientes e finalmente penetra e deteriora a parede da célula, levando a morte dos mesmos. As moléculas fenólicas não são consumidas neste processo e, por sofrerem adsorção reversível, estão aptas para atuarem em outras células de microrganismos ainda vivos. A maioria desses microbicidas apresenta riscos à saúde, por serem carcinogênicos, e riscos ao meio ambiente, por desequilibrarem o ecossistema aquático. Por conta disso, atualmente microbicidas heterocíclicos são comumente usados nos curtumes do mundo inteiro, curtumes estes que buscam alternativas ambientais amigáveis e emergentes.

Abaixo se encontram os dados de toxicidade e ecotoxicidade do PCMC (PAULUS, 2005). Onde DL₅₀ é a dose letal mediana, CL₅₀ é a concentração letal mediana e CE₅₀ é a concentração efetiva mediana.

Dados de toxicidade do PCMC:

- DL₅₀ oral: 1800-5000 mg/kg para ratos;
- DL₅₀ dérmico: > 2000 mg/kg para ratos;
- CL₅₀ por inalação de aerossol: > 704 mg/m³ para ratos (4 h, apenas o nariz).

Dados de ecotoxicidade do PCMC:

- CL₅₀ para *Leuciscus idus*: 1,2mg/L (48 h)
- CL₅₀ para *Onchorhynchus mykiss*: 0,9 mg/L (96 h)
- CE₅₀ para as algas (*Scenedesmus subs.*): > 10 mg/L (96 h)
- CE₅₀ para *Daphnia magna*: 2,29mg/L (48 h)
- CE₅₀ para organismos de lodo ativado: 60 mg/L

2.4.4.2 Microbicidas heterocíclicos sintéticos

TCMTB

O 2-(tiocianometiltio) benzotiazol (TCMTB) é um microbicida não clorofenólico amplamente utilizado na indústria de papel, na inibição de incrustações microbiológicas em águas de refrigeração e na indústria para a conservação de peles e couros, onde foi indicado como um substituto dos microbicidas a base de mercúrio e fenóis, que eram muito utilizados na indústria coureira (REYES *et al.*, 2002).

Com a proibição da importação e exportação de artigos tratados com pentaclorofenol (PCP), o microbicida a base de TCMTB, se tornou um dos microbicidas mais populares do mundo do couro.

Este microbicida é uma substância quimicamente eletrolítica que reage irreversivelmente com substâncias nucleofílicas sendo consumido nesta reação, assim, as moléculas resultantes não são mais TCMTB.

Conforme GRIEBEL (1997), as substâncias nucleofílicas, no caso dos microrganismos, estão presentes na forma de aminoácidos que fazem parte das cadeias protéicas, por exemplo: Cl⁻, OH⁻, HS⁻, RS⁻, NH₃, NR₃. Estas também estão presentes nos banhos de remolho, piquéel, curtimento ou recurtimento e reagirão com a molécula de TCMTB.

Devido à sua baixa solubilidade em água, o TCMTB é formulado a partir de misturas de agentes emulsionantes comerciais (nonilfenoletoxilado contendo alquil-benzeno e sulfato de cálcio) com solventes orgânicos (dimetil-sulfóxido, dimetilformamida, xileno) em diferentes proporções (MUTHUSUBRAMANIAN, 1997).

O resultado de combinações de solventes como hidrocarboneto, óleos vegetais e soluções de glicóis, com tensoativos, em solução emulsionável, é a possibilidade de formular microbicidas com melhor estabilidade e perfeita distribuição do princípio ativo durante a aplicação nos processos de curtimento, avaliando também o impacto ambiental resultante dessa fórmula.

Segundo CÍTERA *et al.* (2006) pode-se reforçar mais algumas vantagens em sua aplicação:

- excelente ação microbicida, apropriado em particular para a conservação de wet-blue;
- microbicida altamente eficiente quando se exige conservação do couro por um tempo mais longo;
- princípio ativo largamente testado;
- solúvel em água;
- boa estabilidade em meio ácido e neutro e decomposição em meio alcalino.
- contém um sistema emulsionante que assegura boa dispersão e distribuição na pele;
- baixa toxicidade;
- não interfere no funcionamento do tratamento biológico das águas residuais até 5 mg/l.

A presença de algumas substâncias como sulfitos, redutores e oxidantes pode inibir a ação do microbicida a base de TCMTB (CÍTERA *et al.*, 2006).

Abaixo se encontram os dados de toxicidade e ecotoxicidade do microbicida TCMTB (PAULUS, 2005).

Dados de toxicidade do TCMTB:

- DL₅₀ oral: 500 mg /kg para ratos
- DL₅₀ dérmico: 1414 mg/kg para ratos

Dados de ecotoxicidade do TCMTB:

- CL₅₀ para Truta arco-íris: 0,1 mg/L (96 h)

OIT

O microbicida n-octiliazolinona possui um amplo espectro de atuação contra fungos e bactérias, é utilizado em torres de resfriamento, na preservação de madeiras, como conservante em produtos domésticos, em tintas, em pisos de vinil, em produtos de borracha /polímero (incluindo chinelos, luvas), em espumas (por exemplo, espuma usada em travesseiros e colchões), em têxteis (por exemplo, estofados, roupas e roupas de cama) e na preservação couro.

É um composto relativamente moderno e atualmente tem sido muito bem sucedido na indústria do couro. Possui algumas vantagens se combinado com outros microbicidas e se as orientações importantes com referência às suas propriedades físicas e químicas especiais são obedecidas (LINDNER e NEUBER, 1990).

Esta substância contém enxofre, nitrogênio e oxigênio em sua formulação que reagem no citoplasma das células microbianas com o grupo “tiol” (-SH), presente nas enzimas e proteínas estruturais.

Este tipo de microbicida, além de ter uma alta solubilidade em água, possui uma elevada afinidade com a pele e uma formulação otimizada de emulsionantes que certifica uma adsorção rápida e homogênea dos ingredientes ativos por parte das peles e couros além da molécula ser rapidamente rompida no efluente, especialmente se o banho contiver compostos alcalinos. Microbicidas a base de OIT atuam satisfatoriamente em pH entre 6,0 e 9,0 e a principal desvantagem é a sua desativação por formas reduzidas de enxofre.

Abaixo se encontram os dados de toxicidade e ecotoxicidade do microbicida OIT (PAULUS, 2005).

Dados de toxicidade do OIT:

- DL₅₀ oral: 760 mg/kg para ratos
- DL₅₀ dérmico: 690 mg/kg para coelhos
- CL₅₀ por inalação de aerossol: 1,25 mg/L para ratos (4 h, apenas pelo nariz)

Dados de ecotoxicidade do OIT:

- CL₅₀ para peixes bluegill (*Lepomis macrochirus*): 0,196 mg/L (96 h)
- CL₅₀ para *Fathead minnow*: 0,140 mg/L (96 h)
- CL₅₀ para Truta arco-íris: 0,065 mg/L (96 h)
- CL₅₀ para *Daphnia magna*: 0,320 mg/L (48 h)

BMC

O Carbendazim é um microbicida de amplo espectro contra uma variedade de espécies de fungos e leveduras, mas é pouco eficaz contra bactérias e algas.

O BMC é um composto pouco solúvel em solventes não aquosos e estável entre pH 2,0 e 12,0. Em meio ácido com pH abaixo de 2,0 ocorre a precipitação do produto. É biodegradável, se rompe no meio ambiente de forma bastante rápida em dois compostos que são o benomil e o tiofanatometílico. Possui uma baixa persistência no solo e pode ser degradado por hidrólise em água, biodeterioração, oxidação, fotólise e biotransformação, além de ser não volátil, resistente ao calor e possuir uma baixa lixiviação (GONZÁLEZ *et al.*, 2011; ANASTASSIADES *et al.*, 1998; PAULUS, 2005).

Este microbicida é amplamente utilizado na agricultura, como conservante em tintas, têxteis, na fabricação de papel, no controle de doenças fúngicas em árvores, bem como na conservação de frutos, verduras e plantas ornamentais (BURROWS e EDWARDS, 2004; SOUSA *et al.*, 2004). Porém na indústria do couro ele não pode ser utilizado sem a combinação de outro componente ativo, pois em altas concentrações pode causar efeitos adversos para a saúde, como distúrbios hormonais (FARAG *et al.*, 2011; ADMINIS *et al.*, 2002; VIKTOROV *et al.*, 2013).

A ação antimicrobiana do BMC baseia-se na severa inibição da síntese do DNA, onde a tubulina é atacada, causando a interrupção da formação de microtúbulos e a divisão celular mitótica (CAN e ALBERTINI, 1997).

Abaixo se encontram os dados de toxicidade e ecotoxicidade do microbicida BMC (PAULUS, 2005).

Dados de toxicidade do BMC:

- DL₅₀ oral: 640 mg/kg para ratos
- DL₅₀ dérmico: >2000 mg/kg para ratos

Dados de ecotoxicidade do BMC:

- CL₅₀ para peixes (*Cyprinus carpio*): 0,61 mg/L (96 h)
- CE₅₀ para *Daphnia magna*: 0,22 mg/L (48 h)
- CE₅₀ para as algas verdes (*Scenedesmus*): 419 mg/L (72 h)

A Figura 2.10 apresenta as estruturas moleculares dos microbicidas usados na indústria do couro.

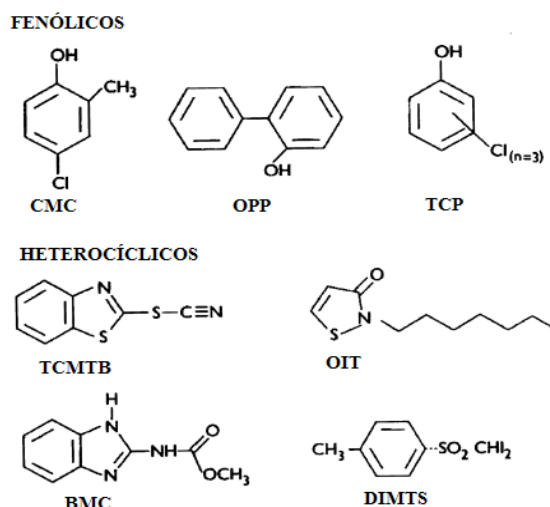


Figura 2.10: Estrutura molecular dos principais microbicidas usados na indústria do couro

2.4.5 Estudos realizados com diferentes microbicidas em couros

No trabalho realizado por CUADROS *et al.* (2012), os autores avaliaram a capacidade fungicida de três microbicidas selecionados: diiodometil-p-tolylsulfone (DIMPTS), 3-iodo-2-propinil-Nbutylcarbamate (IPBC) e thiobendazole/2-tiazol-4-il-1H-benzo-imidazol (TBZ) comparando-as com a de microbicidas utilizados convencionalmente em curtumes tais como TCMTB e uma mistura de compostos fenólicos, contra diferentes estirpes de fungos. Os microbicidas foram aplicados nos processos de curtimento ao cromo, engraxe de couros curtidos com extratos vegetais e no processo de píquel e foram avaliados pelo método de plaqueamento, que consiste em colocar uma amostra de pele ou couro em uma placa de petri e ao seu redor é vertido o meio de cultura apropriado para cada microrganismo, onde é inoculado o microrganismo contaminante conhecido. As placas de petri são incubadas a 26-30 °C por um tempo pré-determinado e o crescimento de fungos na superfície é avaliado e quantificado semanalmente. Utilizando este procedimento, para uma mesma oferta, dois dos três microbicidas estudados diiodometil-p-tolylsulfone (DIMPTS) e 3-iodo-2-propinil-N-butylcarbamate (IPBC) se mostraram bons candidatos como fungicidas alternativos a serem utilizados na indústria do couro.

Em um dos trabalhos realizados no LACOURO, DIEDOVIEC (2009) testou a eficiência do anti-séptico “Triclosan”, que é amplamente usado em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, na preservação fúngica em couros wet-blue, em comparação com um

fungicida conhecido na indústria coureira a base de TCMTB, utilizando o método da câmara tropical, que é um método simples, fácil de ser mantido num curtume, além de permitir que uma grande quantidade de amostras seja simultaneamente testada e avaliada com facilidade. A câmara é constituída basicamente por um tanque com temperatura controlada, altamente contaminado e com aproximadamente 100 % de umidade, onde pedaços de couros curtidos, com e sem fungicidas, são colocados dentro para avaliar o crescimento de fungos na superfície, e são semanalmente avaliados e quantificados por porcentagem de área contaminada. Nesta análise de aplicação dos fungicidas em amostra de couros wet-blue, o Triclosan teve seu poder de inibição microbiológica comparável ao produto de uso industrial.

ABDEL-MAKSoud (2006) avaliou o crescimento fúngico, onde realizou testes mecânicos (resistência à tração e alongamento), além de investigar a morfologia da superfície por MEV, de amostras de couro de curtimento vegetal tratado com e sem lubrificante (óleo ou cera) e com e sem fungicida. Os microbicidas utilizados foram o-fenilfenol, 2,2, metileno-di (4-cloro-fenol) e 2,4,-diclorobenzil álcool. As amostras tratadas e não tratadas foram inoculadas com quatro diferentes cepas de fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, *Alternaria alternata* e *Trichoderma viride*. A avaliação mostrou que as amostras de couro curtido vegetal tratadas com compostos de engraxe contendo fungicida foram mais resistentes à contaminação de fungos do que as amostras usadas como controle tratadas com compostos de engraxe sem fungicida. No entanto, as amostras tratadas com engraxante sem microbicida foram mais resistentes do que amostras tratadas sem engraxante e sem microbicida. Nos testes mecânicos de resistência a tração e alongamento as amostras tratadas com lubrificante e com fungicida tiveram um melhor desempenho para todos os casos.

CHANGQING *et al.* (2006) verificaram por meio de espectrofotometria UV/Vis, a capacidade de absorção do microbicida isotiazolinona e a porcentagem de microbicida que o couro libera quando submetido à lavagem onde peças de couro wet-blue foram tratadas com diferentes concentrações. Os resultados mostraram que a maior capacidade de absorção é cerca de 45 % em 15 minutos e a maior porcentagem de microbicida liberado pelo wet-blue é de 55 % após a lavagem durante 15 minutos.

KANAGARAJ *et al.* (2001) investigaram “um processo mais limpo” para a conservação de peles de cabra, em que substituíram o uso de cloreto de sódio, substância prejudicial para o meio ambiente, por um sistema alternativo mais seguro onde utilizou sílica gel e uma combinação de sílica gel com o microbicida PCMC. A eficácia dos métodos de conservação foi avaliada por vários parâmetros tais como teor de umidade, teor de nitrogênio total,

presença de bactérias, conservação da estrutura fibrosa e teor de carga poluidora gerada no processamento das peles tratadas utilizando as novas técnicas comparado com a conservação com cloreto de sódio. Os resultados obtidos mostram que as técnicas de preservação desenvolvidas foram tão eficientes como a técnica de conservação utilizando cloreto de sódio. Além de apresentar uma redução de custo de 10-15 % no processo de conservação, os métodos desenvolvidos são uma opção viável e eficaz para combater os problemas de poluição de cloreto e sólidos totais dissolvidos.

GODÍNEZ (2003) demonstrou, no seu trabalho a importância do uso de bactericidas no processo de remolho. Foram realizados testes com e sem bactericidas para verificar o benefício da adição do mesmo. Os microbicidas utilizados foram n-hidroximetilditiocarbamato de potássio, dimetilditiocarbamato de potássio, bistiocianato de metilo, bistiocianato de metilo + tiocianometiltiobenzotiazol, 3,5-dimetiltetrahydro-1,3,5,2-h-tiadiazina-2-tiona, n-octilisotiazolin-ona e dibromonitrilopropionamida. Para avaliar a ação bactericida, foram realizados os testes de resistência ao alongamento, tensão e rasgamento no couro como um produto acabado. Foi observada uma perda da força física nas amostras sem adição de bactericida, diretamente atribuída à degradação proteolítica bacteriana e, mais especificamente, a ação proteolítica que ocorre durante a operação de remolho em tempo longo. A degradação proteolítica das fibras da pele afeta as propriedades físicas de resistência ao alongamento e desgaste consideravelmente, embora não pareça afetar tanto a taxa de alongamento. Para evitar tais problemas recomenda-se a aplicação de bactericidas no banho de remolho.

2.4.6 Metabólitos naturais com uso no desenvolvimento biotecnológico

Metabólitos naturais, biologicamente ativos, provenientes de microrganismos são produzidos em resposta a condições ambientais, como mudanças nutricionais, infecções e competições. Estes compostos do metabolismo primário e secundário têm ação analgésica, antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, fungicida e bactericida, e exercem ação específica sobre um determinado ser vivo, seja ele animal, vegetal ou microrganismo, logo são usados para as mais diversas finalidades.

Nas últimas décadas tem-se intensificado a busca de metabólitos secundários bioativos de fontes renováveis (STROBEL, 2004 e GUNATILAKA, 2006). A capacidade dos fungos

filamentosos de crescerem em substratos simples e de produzir diversos metabólitos tem despertado o interesse para o uso biotecnológico desses microrganismos (MEYER, 2008).

Os fungos são conhecidos como produtores de uma grande variedade de metabólitos e, apesar de muitas vezes ser desconhecido o papel dessas substâncias nesses organismos, esses compostos apresentam grande importância na medicina, na indústria e na agricultura. Muitas substâncias podem ser produzidas pelos fungos, como, por exemplo, antifúngicos (STROHL, 2000).

Uma grande vantagem de se trabalhar com microrganismos em relação às demais fontes é a possibilidade de controle nos processos operacionais, pois em comparação com as plantas, os microrganismos crescem mais rapidamente, num período de tempo e espaço menor, podendo ser cultivados em larga escala em fermentadores, onde as condições de cultivo podem ser alteradas para direcionar a produção de metabólitos de interesse, não havendo prejuízo ao ecossistema, nem problemas éticos como os que podem advir da prospecção de metabólitos bioativos a partir de insetos, anfíbios e outras espécies animais (TAKAHASHI e LUCAS, 2008; PEARCE, 1997).

O metabolismo fúngico pode ser dividido em duas partes: geração de metabólitos primários, que fornecem energia e são precursores químicos às células, sendo essenciais para o crescimento e reprodução dos microrganismos; e metabólitos secundários que não aparentam ter função óbvia no crescimento celular, mas que podem estar envolvidos em processos de comunicação entre microrganismo e substratos onde os mesmos se desenvolvem (BRAKHAGE *et al.*, 2010).

2.4.6.1 Trabalhos realizados pelo LACOURO em biotecnologia

Trabalhos realizados no LACOURO por SOUZA e GUTTERRES (2012), DETTMER *et al.* (2012) e MARAFON (2012) vêm buscando alternativas mais limpas de processamento do couro com emprego de biotecnologia nas etapas de ribeira. SOUZA e GUTTERRES (2012) compararam a eficiência entre processos puramente químicos e os processos coenzimáticos (que aplicam agentes químicos e enzimas produzidas por bactérias) aplicados nas etapas de remolho, depilação/caleiro e purga. DETTMER *et al.* (2012) selecionaram e identificaram bactérias produtoras de novas enzimas com possibilidade de utilização no processamento de couros, na etapa de depilação/caleiro, elegeram aquelas com as características mais adequadas (tais como ação sobre a queratina e ação proteolítica), realizaram a otimização do meio e das

condições de cultivo e efetuaram estudos comparativos entre o processo convencional de depilação de peles e o processo substituindo todos os produtos químicos por enzimas. MARAFON (2012) combinou o processo enzimático com emprego de enzimas, produzidas pelo cultivo de *Bacillus subtilis*, com peróxido de hidrogênio, no processo de depilação enzimático-oxidativo, alternativo ao processo convencional (cal e sulfeto de sódio).

Em um dos trabalhos do LACOURO, FUCK *et al.* (2013) produziram e aplicaram corantes fúngicos extraídos de *Penicillium* spp., *Monascus* spp. E *Fusarium* spp. no tingimento de couro. Estes fungos foram usados em bioprocessos para a produção de corantes naturais por cultura em meio líquido, extração, concentração e aplicação no tingimento. Cada fungo foi inoculado a uma concentração inicial de 10^6 esporos / mL em caldo de dextrose de batata sob incubação durante 21 dias a 120 rpm e 30 °C. Neste trabalho foram avaliados alguns parâmetros como a eficiência do tingimento, a absorção do corante, a estabilidade térmica e a solidez a luz. As amostras de couro tingidas mostraram boa penetração e homogeneidade de cor. Nesta linha de aplicação de produtos naturais em outro trabalho do grupo, BORDINGNON *et al.* (2012) estudaram a aplicação de urucum (*Bixa Orellana* L.) e cochonilha do carmim (*Dactylopius coccus*) como alternativas ao uso de corantes sintéticos na indústria do couro. Este trabalho analisou a capacidade de tingimento de couro wet-white com corantes naturais além de analisar algumas variáveis que interferem na difusão e fixação dos corantes. Os corantes naturais testados apresentaram boa cobertura da superfície do couro, boa penetração e equalização do tingimento.

Fungos filamentosos também produzem metabólitos secundários com atividade antifúngica, estes compostos acumulam-se no meio de cultura no fim da fase de crescimento exponencial (fase estacionária). Estes produtos não conferem nenhuma vantagem evolutiva, porém em termos competitivos, os microrganismos produtores de compostos antifúngicos são favorecidos em relação aos que não produzem estes compostos (KELLER *et al.*, 2005). Esses tipos de substâncias químicas matam ou inibem o crescimento de outras espécies fúngicas, mesmo que em pequenas quantidades, com menor impacto para o meio ambiente, menor custo e com menor risco para a saúde humana em relação ao emprego de fungicidas sintéticos.

Capítulo 3

Metodologia experimental

Para avaliar o desempenho de microbicidas utilizados na indústria coureira foram realizados testes de aplicação destes em peles e couros seguidos de ensaios microbiológicos de plaqueamento, de acondicionamento em câmara tropical e de biodeterioração no solo, e respectivas análises (visual, MEV e ensaio de tração). Também foi testada a sorção e *wash-out* dos microbicidas em couros wet-blue. Outro teste feito nos próprios microbicidas foi o de concentração inibitória mínima (MIC).

Neste capítulo serão descritas as etapas envolvidas na elaboração da parte experimental deste trabalho. Primeiramente serão apresentados os microbicidas e microrganismos e a preparação destes. Após, serão apresentados os experimentos para aplicação dos microbicidas e formulações de remolho, píquel e curtimento utilizadas, os procedimentos para ensaios microbiológicos e outros ensaios. O trabalho foi realizado no Laboratório de Estudos em Couro e Meio Ambiente (LACOURO), no Departamento de Engenharia Química (DEQUI) da UFRGS.

3.1 Microbicidas testados

Os seguintes microbicidas utilizados nos experimentos foram fornecidos pelas empresas Buckman, ATC e Thor:

- 1) 2-(tiocianometiltio) benzotiazole (TCMTB)
- 2) Isotiazolina
- 3) Dispersão oleosa de 2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona+ carbendazim (OIT+BMC/óleo)
- 4) Dispersão aquosa de 2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona+ carbendazim (OIT+BMC/água)
- 5) 2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona (OIT)
- 6) para-cloro-meta-cresol (PCMC)

Os microbicidas foram testados através dos seguintes ensaios de aplicação e análises:

- I. Aplicação durante o remolho de peles, no piqué e no curtimento com tanino vegetal: para todos microbicidas acima com exceção do PCMC.
- II. Aplicação no curtimento com cromo: todos microbicidas
- III. Teste de Concentração inibitória mínima (MIC), absorvidade e lixiviação: TCMTB, OIT+BMC/água e PCMC).

Neste trabalho foi feita ainda a tentativa de emprego de metabólitos secundários produzidos pelos fungos *Aspergillus niger*, *Monascus purpureus*, *Diplodia* e *Fusarium graminearum*, como fungicida em couro wet-blue. Os resultados foram insatisfatórios quanto à ação microbicida e esta parte do trabalho encontra-se no Anexo A.

3.2 Microrganismos contaminantes utilizados

Os microrganismos testados como contaminantes foram fornecidos pelo Laboratório de Bioquímica e Microbiologia aplicada, do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da UFRGS. Na tabela 3.1 estão listados os fungos que foram testados em peles piqueladas, curtidas ao cromo e curtidas com tanino vegetal e as bactérias que foram testadas em peles remolhadas.

Tabela 3.1: Microrganismos contaminantes testados

Fungos (ensaios em peles piqueladas e curtidas)	Bactérias (ensaios em peles remolhadas)
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Eschericia coli</i>
<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Penicillium herguei</i>	<i>Streptomyces sp.</i>

3.2.1 Repicagem e Preparação das Suspensões

Bactérias

As bactérias foram repicadas para formação de colônias em placas de Petri utilizando o meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) da marca Oxoid dissolvido em água destilada. A solução foi preparada em 37 g BHI / L água e esterilizada em autoclave durante 15 min a 121 °C. As placas foram deixadas na estufa microbiológica a temperatura de 28 °C durante dois dias.

A partir de colônias isoladas das culturas, prepararam-se as suspensões em solução aquosa, onde foram adicionado 3 mL de água ultra-pura na placa de Petri para formar a suspensão de bactéria, em seguida, coletaram-se 3 mL desta suspensão para medição da turbidez. A turbidez das suspensões foi ajustada para um padrão de 0,5 UNT (aproximadamente 10^8 UFC / mL).

Fungos

Os fungos filamentosos foram repicados para crescimento e multiplicação em placas de Petri utilizando o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) da marca Oxoid dissolvido em água destilada. A solução foi preparada em 39 g BDA/L água e esterilizada em autoclave durante 15 min a 121 °C. As placas foram deixadas na estufa microbiológica a temperatura de 28 °C durante sete dias.

As suspensões de esporos de fungos foram preparadas em meio aquoso a partir das culturas repicadas. Foram adicionados 3 mL de água ultra-pura na placa de Petri para formar a suspensão de esporos, após o que, coletaram-se 3 mL desta suspensão para contagem dos esporos.

A contagem de esporos foi realizada utilizando câmara de Neubauer onde a suspensão do inóculo foi ajustada para 10^5 esporos/mL através de diluições.

3.3 Experimentos para aplicação dos microbicidas em peles e couros

Para avaliar o desempenho dos microbicidas selecionados para a preservação de peles e couros, foram realizados testes de aplicação dos mesmos nas etapas de remolho, píquel e curtimento de peles.

A ação microbicida nas amostras de peles e couros tratados foi testada por testes microbiológicos acelerados de plaqueamento e de acondicionamento em câmara tropical. Foi feito ainda um teste preliminar de biodeterioração no solo.

A avaliação das amostras de peles e couros expostas aos ataques de microrganismos foi feita por meio de observação visual, de captura de imagem em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por ensaios de tração.

Para a realização deste trabalho, foi utilizada uma pele bovina piquelada de 22 kg, provinda do curtume Nimo (Montenegro, RS) e outra pele bovina salgada e pré-descarnada, proveniente de uma unidade do curtume Minuano (Caçapava do Sul, RS). Foram tomados vários pedaços das peles, os quais foram divididos em amostras de cerca de 40 g (medindo aproximadamente 15 cm x 12 cm) para utilizar como material de partida nos experimentos.

A pele piquelada foi utilizada pra realizar os experimentos de píquel, de curtimento com cromo e de curtimento com tanino vegetal. A pele salgada foi utilizada para realizar o experimento de remolho.

Os experimentos foram conduzidos em um sistema de fulões de bancada (Figura 3.1) com controle de rotação e temperatura, com as respectivas formulações de cada etapa de processo, onde os produtos adicionados foram calculados sobre a massa total dos pedaços de pele em cada fulão.



Figura 3.1: Fulão de bancada utilizado para os testes de aplicação de microbicidas em peles e couros

3.3.1 Experimentos de remolho

Foram realizados seis experimentos na etapa de remolho de peles: cinco para testar a aplicação dos microbicidas (TCMTB, isotiazolina, OIT+BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT) e um sem adição de microbicida (controle), onde foi colocado um pedaço de pele em cada fulão. As amostras de peles estão apresentadas na Figura 3.2. Inicialmente removeu-se o excesso de sal sobre as peles manualmente. Após, as peles foram colocadas no fulão seguindo a formulação da Tabela 3.2, sendo que após a primeira lavagem, as peles foram retiradas do fulão para raspagem (remoção) dos pelos para permitir a verificação da proteção microbicida diretamente sobre a própria superfície epidérmica. Cabe observar que em curtumes esta raspagem não é feita, pois os pelos são removidos posteriormente durante as etapas de depilação e caleiro das peles.

Tabela 3.2: Formulação de remolho com adição de microbicida

Processo	Quantidade	Produto	Controle
Lavagem	200 %	Água	15 min esgotar o banho, retirar a pele para remover os pelos
Remolho	200 %	Água	
	0,3 %	Carbonato de sódio	
	0,15 %	Eusapon [®] L-DE	
	0,2 %	Microbicida*	180 min esgotar o banho

*com exceção da amostra controle

O carbonato de sódio, que é um produto básico, tem por objetivo aumentar a velocidade de reidratação da pele, elevar o pH e formar sabões com as gorduras da pele. O tensoativo Eusapon[®]L-DE reduz a tensão superficial da água auxiliando no desengraxe das peles e na emulsificação das gorduras naturais.



Figura 3.2: Pedacos de peles utilizadas no processo de remolho

3.3.2 Experimentos de Píquel

Na etapa de píquel foram realizados sete experimentos: seis para testar a aplicação dos microbicidas (TCMTB, Isotiazolina, OIT+BMC/óleo, OIT+BMC/água, OIT e PCMC) e um sem adição de microbicida (controle), onde foi colocado um pedaço de pele em cada fulão. A formulação de píquel está colocada na Tabela 3.3. A finalidade do píquel é acidificar a pele para a etapa de curtimento e finalizar a etapa de desencalagem, pois o cálcio quimicamente ligado só pode ser totalmente eliminado com valores de pH baixos.

Inicialmente foi preparada uma solução salina com valor de grau Baumé ($^{\circ}\text{Bé}$) > 5 , com o objetivo de estabelecer uma igualdade de concentração entre o meio interno e externo da pele, ou seja, estabelecer o equilíbrio osmótico, já que a acidez elevada da pele provocaria o inchamento ácido. Após atingir este equilíbrio, iniciou-se a adição de ácido. Adicionou-se um ácido orgânico fraco (ácido fórmico), diluído numa porção de uma parte de ácido para dez de água, para a pele não reagir exotermicamente (queimar). Em seguida, fez-se a adição de um ácido forte (ácido sulfúrico), diminuindo o pH do banho e da pele para uma faixa entre 2,5–3,0. Após 30 minutos de processo verificou-se o pH da pele, com um corte na mesma e uso do

indicador verde de bromocresol, que em caso de obtenção de coloração amarelada indica pH abaixo de 3,0.

Tabela 3.3: Formulação de Píquel com adição de microbicida

Processo	Quantidade	Produto	Controle
Píquel	200 %	Água	°BÉ > 5 30 min pH < 3 180min esgotar o banho
	5 %	Cloreto de sódio	
	0,2 %	Ácido fórmico (1:10)	
	0,2 %	Ácido sulfúrico (1:10)	
	0,2 %	Microbicida*	

*com exceção da amostra controle

3.3.3 Curtimento com cromo

Na etapa de curtimento com cromo foram realizados seis experimentos para testar a aplicação dos microbicidas (TCMTB, isotiazolina, OIT+BMC/óleo, OIT+BMC/água, OIT e PCMC),e mais um sem adição de microbicida (controle), onde foi colocado um pedaço de pele em cada fulão cuja formulação está colocada na Tabela 3.4. No curtimento com cromo, foram adicionados 9 % do sal de cromo no banho e após 3 horas de processo, foram adicionados os microbicidas.

O curtimento trata-se de um processo demorado, com no mínimo 6 horas de duração, pois é necessário um tempo para difusão dos compostos de cromo. Deste modo, evitam-se curtimentos superficiais, fazendo com que os sais curtentes penetrem em toda a estrutura fibrosa, estabilizando a estrutura do colágeno.

Ao final, há a etapa de basificação que tem como finalidade fixar os sais de cromo à pele, com adição de compostos alcalinos, através do aumento de pH, até que atinja valores próximos a 4,0. A temperatura do banho que inicialmente estava a 20 °C, foi elevada em 5 °C a cada 30 minutos, até que atingiu a temperatura de 40 °C, a qual permaneceu constante durante o restante do tempo de processo.

Após a basificação, a exemplo do píquel, também é usado o verde de bromocresol como indicador do pH da pele, que deve dar uma coloração“verde maçã”, indicando um pH em torno de 4,0. Valores de pH acima de 4,0 podem causar precipitações de hidróxido de cromo sobre a pele.

Os microbicidas foram adicionados na quantidade de 0,2 %, seguindo recomendações dos fabricantes dos produtos químicos. Para verificar a eficiência destas ofertas frente à

recomendada, foram feitos testes adicionais com ofertas de 0,1 e 0,4 % dos microbicidas TCMTB, OIT+BMC/água e PCMC.

Tabela 3.4: Formulação do curtimento com cromo com adição de microbicida

Processo	Quantidade	Produto	Controle
Píquel	200 %	Água	
	5 %	Cloreto de sódio	
	0,2 %	Ácido fórmico (1:10)	
	0,2 %	Ácido sulfúrico (1:10)	30 min pH < 3
Curtimento	9 %	Sal de cromo Cromossal-B	180 min
	0,2 %	Microbicida*	180 min
Basificação	0,5 %	Óxido de magnésio	360 min pH (3,8 - 4,2) esgotar o banho

*com exceção da amostra em branco controle e outras duas dosagens testadas de 0,1 e 0,4 %

Foram realizados novos curtimentos sem adição de microbicida, para 3 amostras de pele piqueladas medindo 60 mm x 40 mm, para posterior uso no teste de absorvidade e *wash-out*.

Após o curtimento com cromo, foi verificado o teor de cromo presente nos couros wet-blue. O teor de cromo indica o grau de curtimento, sendo que baixos teores de cromo fixado no couro wet-blue podem comprometer todo o processo, resultando em couros com baixa resistência térmica e mecânica. A técnica utilizada para determinar o teor de cromo, foi realizada conforme a norma ASTM D 2807, onde uma amostra de couro curtida é calcinada em mufla por um período de 1 hora a uma temperatura de 800 °C. A partir das cinzas obtidas, procede-se a digestão com ácidos e posteriormente oxidação com ácido perclórico.

O teor de cromo encontrado em ensaio em triplicata das amostras de couro wet-blue obtidas foi de 4,64 %.

Realizou-se o teste de retração, onde amostras de couro medindo 5,0 cm x 2,0 cm são imersas em água a 100 °C (exigida para couro wet-blue) por 2 minutos, em seguida, as novas dimensões são verificadas. A retração deve ser menor que 2 %. Este ensaio visa avaliar a estabilidade hidrotérmica proporcionada à pele devido ao processo de curtimento.

O couro wet-blue não apresentou modificações nas suas dimensões, como era desejado, ou seja, a porcentagem de retração foi de 0 %.

3.3.4 Curtimento com tanino vegetal

Na etapa de curtimento com tanino vegetal foram realizados seis experimentos: cinco para testar a aplicação dos cinco microbicidas (TCMTB, Isotiazolina, OIT+BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT), e um sem adição de microbicida (controle), onde foi colocado um pedaço de pele em cada fulão e cuja formulação está apresentada na Tabela 3.5.

Após as amostras passarem pelo píquél, foram pré-condicionadas com a adição de sulfato de sódio com o objetivo de favorecer a difusão do tanino vegetal para o interior da pele, evitando assim uma sobrecarga do curtente na superfície. Após o esgotamento do banho, adicionou-se tanino vegetal de extrato de mimosa (Weibull Black). Na etapa de engraxe, óleo sulfitado, óleo sulfatado e os microbicidas foram adicionados. Nesta etapa, deve-se ter o cuidado para que os óleos penetrem no couro afim de não conferirem toque graxoso superficial indesejado e que o couro fique com a maciez esperada. Por último, foi adicionado ácido orgânico para auxiliar na fixação do tanino vegetal e do óleo.

Os microbicidas foram adicionados na quantidade de 0,2 %, seguindo recomendações dos fabricantes dos produtos químicos. Para verificar a eficiência destas ofertas frente à recomendada, foram feitos testes adicionais com ofertas de 0,5 e 0,75 % dos microbicidas TCMTB e OIT+BMC/água, neste ensaio foram adicionadas ofertas maiores de microbicida para comparação, em relação ao ensaio com curtimento ao cromo (0,1 e 0,4 %), pois os couros curtidos com tanino vegetal possuem uma maior propensão à contaminação de fungos do que os couros curtidos com cromo.

Tabela 3.5: Formulação do curtimento com tanino vegetal com adição de microbicida

Processo	Quantidade	Produto	Controle
Píquél	200 %	Água	30 min
	5 %	Cloreto de sódio	
	0,2 %	Ácido fórmico (1:10)	
	0,2 %	Ácido sulfúrico (1:10)	
Pré-condicionamento	100 %	Banho de píquél	120 min pH < 3
	1,2 %	Sulfato de sódio	
Curtimento	100 %	Água	60 min 60 min 120 min
	10 %	Tanino vegetal	
	10 %	Tanino vegetal	
	10 %	Tanino vegetal	
Engraxe	50 %	Água	
	7 %	Óleo sulfitado	

Fixação	6 %	Óleo sulfatado Microbicida* Água Ácido fórmico (1:10)	60 min
	0,2 % 100 % 1 %		20 min esgotar o banho

*com exceção da amostra controle e outras duas dosagens testadas de 0,5 e 0,75 %

As amostras curtidas com tanino vegetal foram submetidas ao teste de retração nas temperaturas de 70 °C (exigida para este tipo de curtimento) e não apresentaram modificações nas suas dimensões, ou seja, não retraíram.

3.4 Testes microbiológicos das peles e couros

Para observar e quantificar o crescimento de microrganismos nas amostras de peles (remolhadas e piqueladas) e couros (wet-blue e com tanino vegetal) foram feitos os testes microbiológicos acelerados. Estes testes foram realizados nas condições ideais para o crescimento dos microrganismos na tentativa de simular o desempenho dos microbicidas. Nem sempre um bom desempenho em testes acelerados significa uma boa proteção de peles e couros em condições reais e vice-versa. Na maioria dos casos, existe uma correlação razoável entre testes acelerados e aplicações industriais. Os testes acelerados mais usados em laboratórios para testes de microbicidas são o teste de Plaqueamento e o teste em Câmara Tropical, que são explicados a seguir. Realizou-se ainda o teste de biodeterioração das peles e couros no solo, também descritos na sequência.

3.4.1 Determinação da resistência ao ataque bacteriano por plaqueamento

O teste de plaqueamento foi realizado para avaliar a eficiência dos microbicidas contra quatro diferentes bactérias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptomyces* sp.. Pedacos das peles remolhadas medindo 2,5 cm x 2,5 cm foram plaqueadas em placas estéreis e meio de cultura BHI. Após a solidificação do meio, três gotas (0,15 mL) da suspensão de cada bactéria foram inoculadas diretamente sobre a placa, uma sobre a amostra de pele e outras duas gotas sobre o meio de cultura, como mostrado na Figura 3.3. Os plaqueamentos foram feitos em triplicata para cada uma das bactérias separadamente. As placas foram incubadas em estufa com temperatura controlada de 28 °C. O crescimento bacteriano foi avaliado semanalmente por verificação visual durante 21 dias.

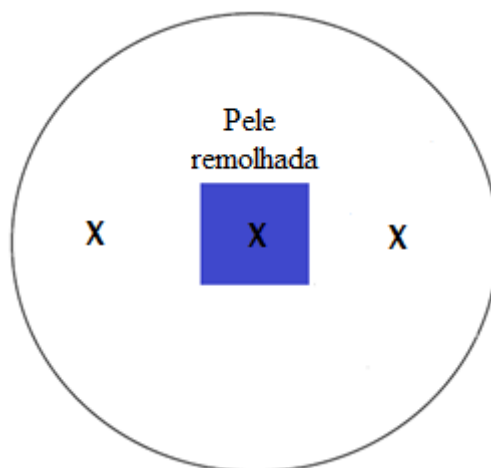


Figura 3.3: Pontos de inoculação (x) da suspensão de bactérias nas placas

3.4.2 Determinação da resistência ao ataque fúngico por plaqueamento

O teste por plaqueamento foi realizado para avaliar a eficiência dos microbicidas contra quatro fungos selecionados, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium herguei* e *Penicillium chrysogenum*. O controle foi realizado de acordo com a norma padrão *Standard Test Method for Mold Growth Resistance of Wet Blue*, ASTM D 4576-08, onde pedaços de peles piqueladas e couros curtidos medindo 2,5 cm x 2,5 cm foram plaqueadas em placas estéreis e meio de cultura BDA. Após a solidificação do meio, duas gotas (0,10 mL) da suspensão de esporos de cada fungo foram inoculadas diretamente sobre a placa, uma sobre a amostra e outra sobre o meio de cultura à distância de 4,5 cm da amostra como mostrado na Figura 3.4.

Os plaqueamentos foram feitos em duplicata para cada um dos fungos separadamente. As placas foram incubadas em estufa com temperatura controlada de 28 °C. O controle de crescimento dos fungos foi realizado semanalmente por verificação visual, durante 28 dias.

No plaqueamento com fungos, optou-se por introduzir outro parâmetro de avaliação, chamado de 'distância de inibição' (Figura 3.4), que é a medição da abrangência da ação da inibição do microbicida presente na amostra de couro sobre o crescimento de fungo. Devido a isto, o inóculo dos esporos de fungos é realizado a distância de 4,5 cm do couro e a alteração da distância de inibição (DI) é medida semanalmente a medida que os fungos vão crescendo.

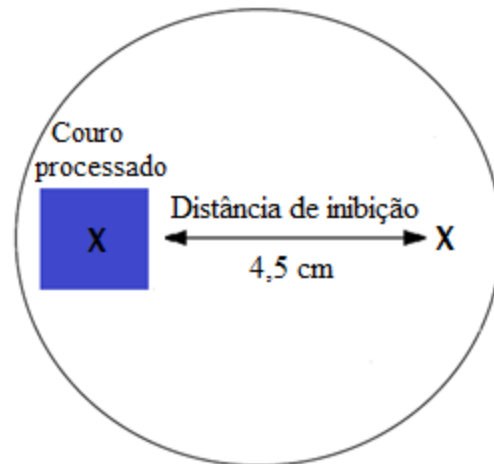


Figura 3.4: Pontos de inoculação (x) da suspensão de esporos

3.4.3 Câmara tropical

O método da câmara tropical é um método simples, fácil de ser realizado em curtume, além de permitir que uma grande quantidade de amostras seja simultaneamente testada e avaliada com facilidade.

Para a realização deste teste uma câmara tropical foi montada no laboratório, baseada em descrições da *Standard Test Method for Evaluating the Resistance of the Surface of Wet Blue to the Growth of Fungi in an Environmental Chamber*, NORMA ASTM D7584 –10, e em DIEDOVIC (2009) com algumas adaptações como mostra a Figura 3.5.

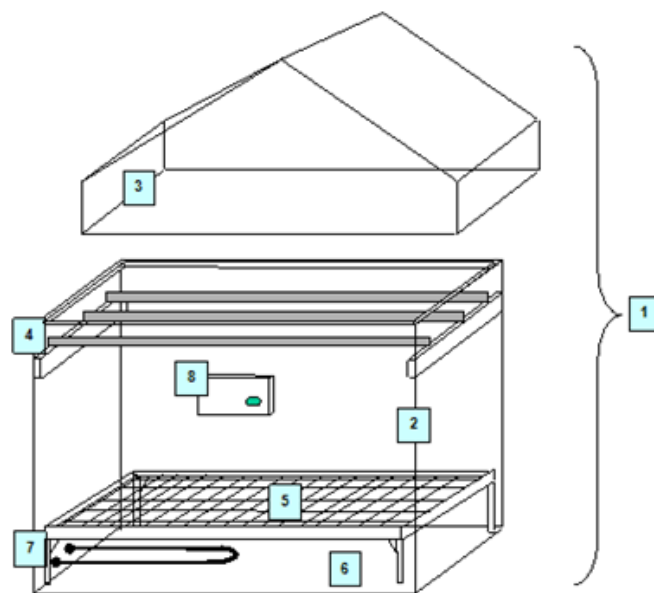


Figura 3.5: Sugestão de construção da câmara tropical.
Fonte: DIEDOVIC (2009).

A câmara utilizada neste trabalho foi constituída das seguintes partes:

- 1) Gabinete hermético: adaptou-se a um aparelho de banho-maria à função de câmara tropical;
- 2) Suporte de aço inox ou acrílico: próprio tanque do aparelho de banho-maria;
- 3) Tampa: foram substituídas por paredes de filme plástico sustentadas por uma haste metálica para evitar que gotas condensadas caíssem sobre as amostras confinadas;
- 4) Barras de sustentação: utilizaram-se barras metálicas colocadas paralelamente que sustentaram as amostras;
- 5) Bandeja contendo a terra contaminada: as bandejas foram substituídas por placas de Petri contaminadas;
- 6) Recipiente para contenção da água: próprio compartimento do banho-maria, o qual permitiu que a resistência elétrica permanecesse imersa;
- 7) Resistência de aquecimento para manter a temperatura nas condições de uso: a própria resistência do banho-maria;
- 8) Painel de controle: o painel de controle do próprio banho-maria.

Foram recortadas duas amostras de aproximadamente 9,0 cm x 3,0 cm de cada couro curtido. As amostras (testes em duplicata) foram penduradas na câmara tropical, por um período de quatro semanas, para avaliar o crescimento de fungos na superfície. A temperatura interna foi mantida a 30 °C. O fungo utilizado como contaminante foi o *Aspergillus niger*. As amostras foram semanalmente avaliadas durante 28 dias e foi quantificada a porcentagem de área contaminada.

A Figura 3.6 mostra a câmara tropical adaptada disposta no laboratório para a realização do experimento.



Figura 3.6: Câmara tropical adaptada para o experimento

As Figuras 3.7 (a) e 3.7 (b) mostram os pedaços de couro wet-blue e couro com tanino vegetal usados no teste e a disposição dos mesmos dentro da câmara tropical.

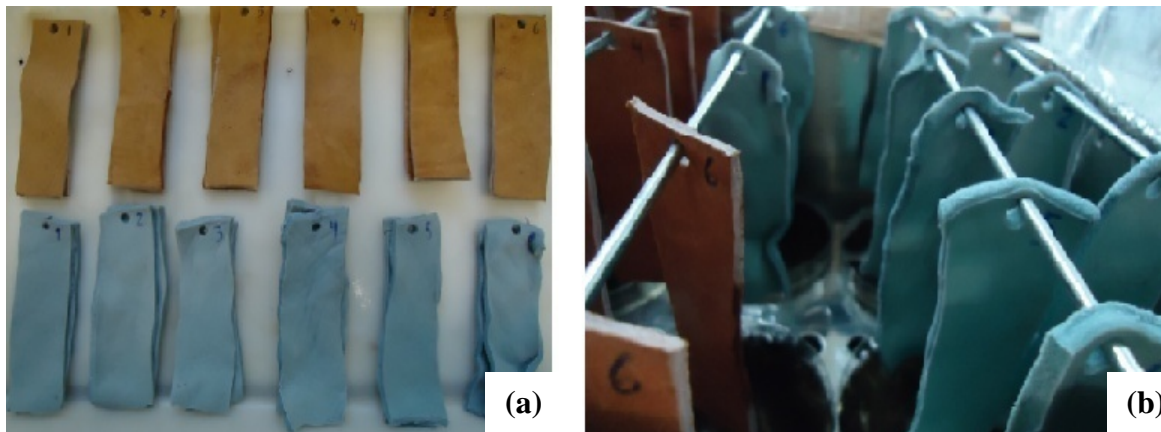


Figura 3.7: (a) amostras de couro utilizadas no teste e (b) disposição dos couros na câmara tropical

3.4.4 Processo de biodeterioração no solo

Na degradação microbiana, microrganismos heterotróficos (fungos e bactérias) decompõem compostos orgânicos que são fontes de carbono e energia, e como resultado há a redução da massa e a transformação da estrutura física e química inicial do material atacado.

Neste teste, seis amostras de couro wet-blue e seis amostras de couro curtido com tanino vegetal tratadas com os diferentes microbicidas e mais uma amostra controle, medindo 7,0 cm x 3,0 cm, foram enterradas a 10 cm de profundidade em terra de adubação orgânica. Depois de 45 dias, foi medida a perda de massa das amostras enterradas (base seca), para avaliar a resistência dos microbicidas ao ataque de microrganismos. As características da terra utilizada (substrato para plantas pronto para uso) são: mistura de terras vermelha, preta e rocha calcária moída, teor de umidade 40 %, condutividade elétrica 30 - 40 $\mu\text{S}/\text{cm}$, pH $6\pm 0,5$, densidade a 20 °C de 950,9 Kg/m^3 .

3.5 Ensaio de tração no couro

O objetivo da determinação da resistência à tração e ao alongamento é verificar a força máxima necessária para romper um corpo-de-prova sob tração e, ao mesmo tempo, verificar o seu alongamento no momento da ruptura. O experimento baseia-se na norma Determinação da resistência à tração e alongamento NBR 11.041. O ensaio é realizado em uma máquina universal de tração (dinamômetro) com velocidade de afastamento entre as pinças reguladas de 100 +/- 10 mm/min e com registrador gráfico acoplado. Os 24 corpos-de-prova de couro wet-blue e curtidos com extrato vegetal, provindos do teste da câmara tropical, cortados adequadamente para a realização do teste, foram fixados entre as duas pinças reguladas que realizam tração, a fim de romper o corpo-de-prova. A força de tração por área é determinada dividindo a força de ruptura (N) pelo produto da largura e espessura das amostras (mm^2). O resultado é expresso em N/mm^2 . O cálculo do alongamento é realizado a partir da leitura da distância entre pinças reguladas do equipamento no momento da ruptura. O alongamento à ruptura é determinado em porcentagem.

3.6 Determinação da concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (MIC) consiste na menor concentração (expressa em mg/L) de um agente antimicrobiano que inibe o crescimento de um microrganismo após um certo período de incubação. Cada microbicida tem uma MIC específica para cada microrganismo.

Para determinar a concentração inibitória mínima, foram preparadas diversas diluições dos microbicidas a base de TCMTB, PCMC e OIT+BMC/água em concentrações que

variaram de 40 mg/L a 2560 mg/L. Um mililitro (mL) de cada diluição foi misturado com 19 ml de meio de cultura BDA e vertido sobre uma placa de Petri, onde uma gota (0,015 mL) de cada suspensão de esporos dos fungos, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium herguei* e *Penicillium chrysogenum*, foi inoculada. Cada ensaio foi realizado em duplicata. Placas contendo somente o meio sem a adição de microbicida foram utilizadas como controle positivo. As placas foram incubadas a 25 °C em um período de 7 dias.

A concentração mais baixa em que o crescimento de fungos não foi observado é considerada a concentração inibitória mínima do microbicida para um determinado microrganismo. A Tabela 3.6 apresenta as diluições realizadas.

Tabela 3.6: Diluições realizadas para os ensaios de MIC

Concentração antimicrobiana obtida (mg/L)	Concentração final após adição de 19 mL de meio de cultura
2560	128,00
2000	100,00
1600	80,00
1400	70,00
1280	64,00
640	32,00
500	25,00
320	16,00
200	10,00
160	8,00
130	6,50
115	5,75
100	5,00
80	4,00
75	3,75
70	3,50
65	3,25
60	3,00
50	2,50
40	2,00

3.7 Sorção e “wash-out”

Neste caso, foram testados três microbicidas (TCMTB, OIT+BMC/água e PCMC) para couro wet-blue. As amostras de um couro wet-blue foram tomadas de um couro adquirido (curtido sem adição de microbicida) anteriormente e disponível no LACOURO.

Primeiramente foi realizada uma varredura espectrofométrica UV/Vis dos três microbicidas a fim de encontrar os comprimentos de onda dos compostos químicos. Os espectros de absorção no UV/Vis dos microbicidas estão apresentados nas Figuras 3.8 a 3.10.

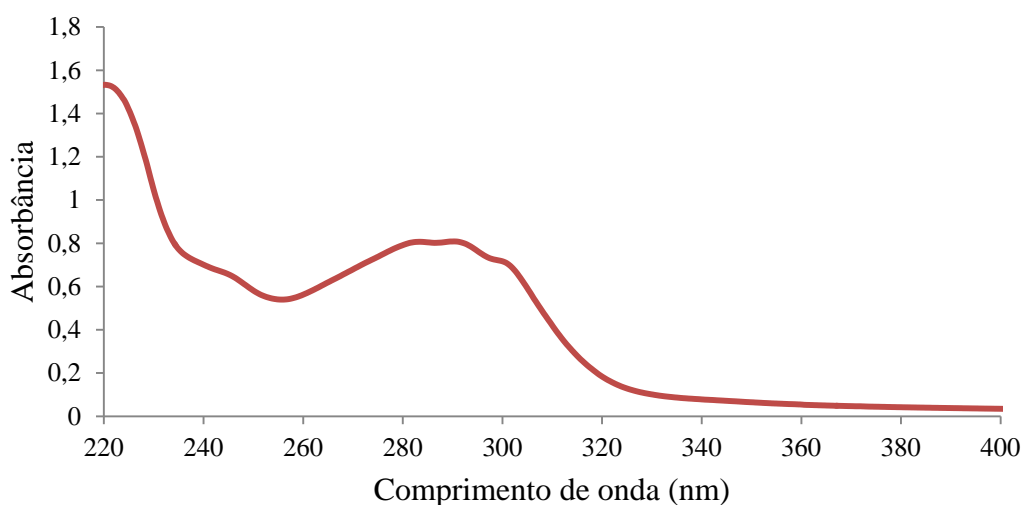


Figura 3.8: Espectro de absorção do microbicida à base de TCMTB

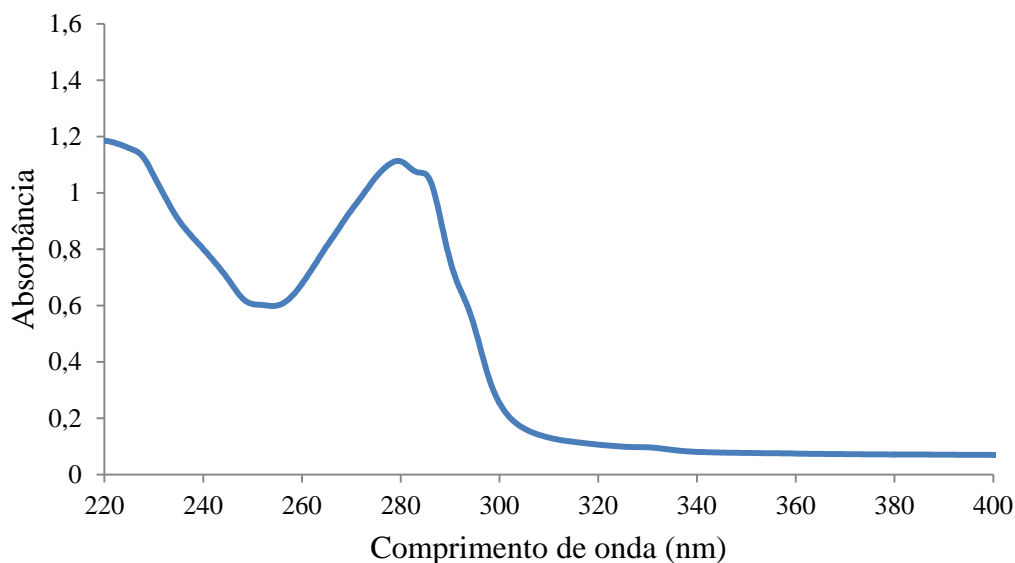


Figura 3.9: Espectro de absorção do microbicida à base de OIT+BMC/água

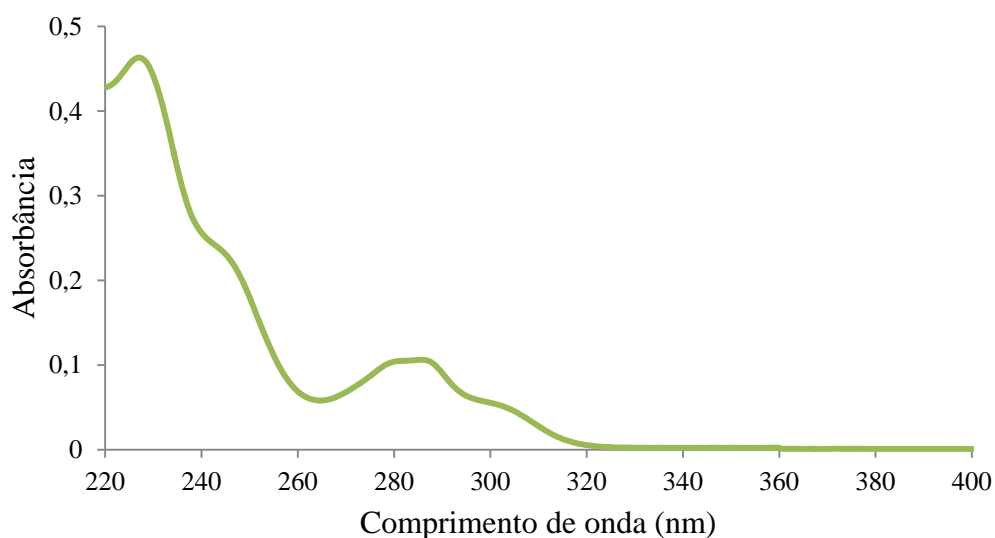


Figura 3.10: Espectro de absorção do microbicida à base de PCMC

Em seguida foi montada uma curva de calibração de absorção padrão, para cada um dos microbicidas estudados. A absorbância foi medida, nos comprimentos de onda de 290 nm para o TCMTB, 279 nm para OIT+BMC/água e 285 nm para o PCMC, por espectrofotometria de UV/Vis, respectivamente. As Figuras 3.11 a 3.13 mostram as curvas de calibração para os microbicidas.

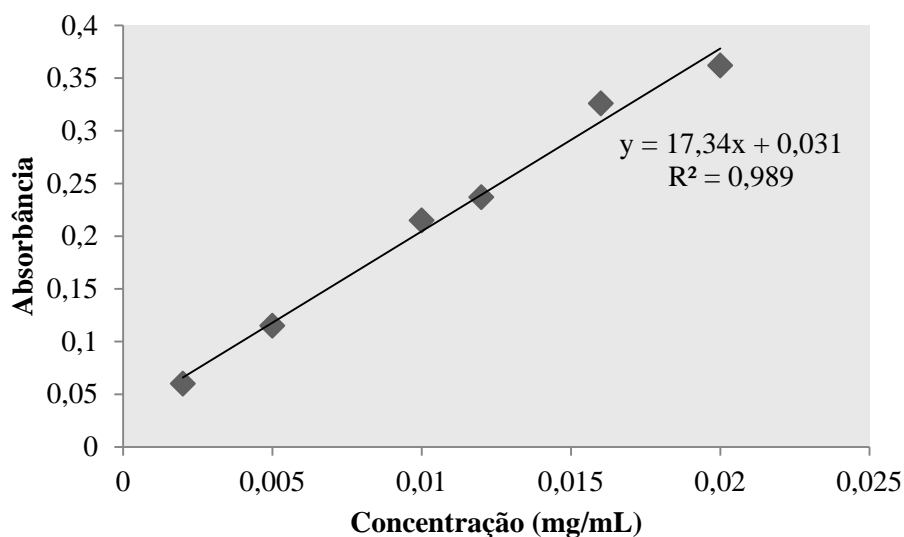


Figura 3.11: Curva de calibração para o microbicida à base de TCMTB

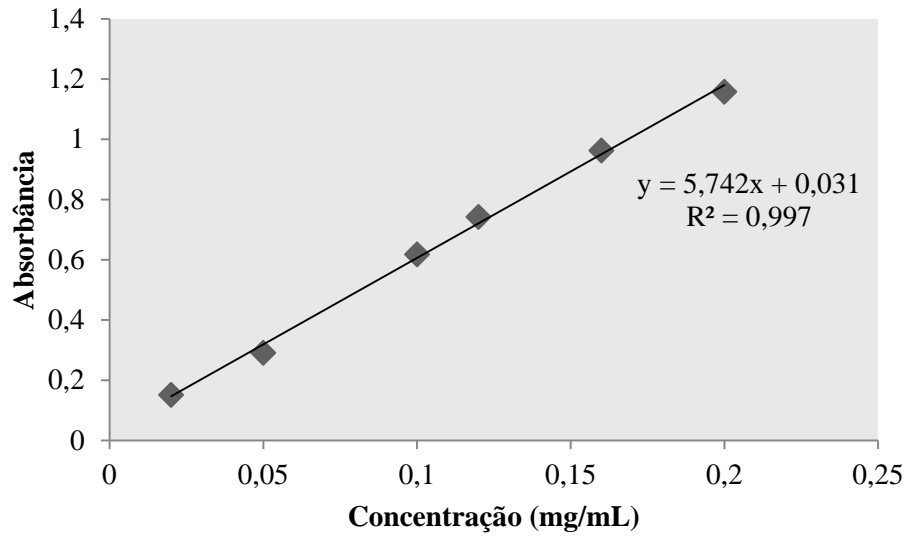


Figura 3.12: Curva de calibração para o microbicida à base de OIT+BMC/água

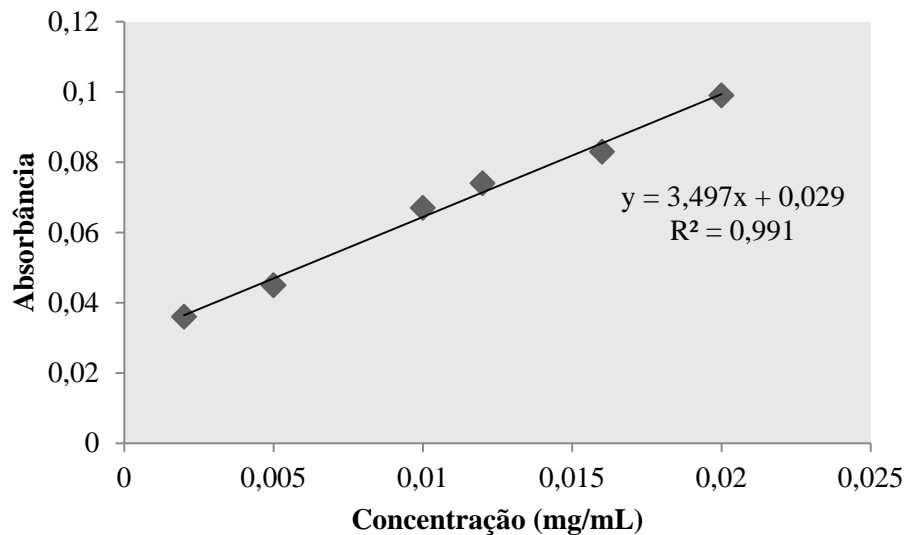


Figura 3.13: Curva de calibração para o microbicida à base de PCMC

Pedaços de couros wet-blue (curtidos previamente), medindo 6,0 cm x 4,0 cm de aproximadamente 30 gramas, foram colocados em diferentes fulões de bancada juntamente com 100 % de água e diferentes concentrações de microbicida, de acordo com a Tabela 3.7.

Tabela 3.7: Concentrações utilizadas para os testes de sorção

TESTE	Oferta de microbicida	
1	TCMTB	0,20 %
2	TCMTB	0,50 %
3	OIT + BMC/água	0,20 %
4	OIT + BMC/água	0,50 %
5	PCMC	0,20 %
6	PCMC	0,50 %

Após decorrer 2, 5, 10, 15, 30 e 60 minutos do experimento, 1 mL do banho dos fulões foi retirado e analisado por espectrofotometria UV/Vis. A partir das curvas de calibração, calculou-se a capacidade de absorção (absortividade) dos três microbicidas, pelo couro wet-blue.

Para o teste de *wash-out*, as amostras de wet-blue, tratadas no teste de absortividade, foram então removidas dos fulões e colocadas novamente nos mesmos com 200 % de água adicionada para a lavagem das mesmas. Após 2, 5, 10, 15, 30 e 60 minutos, 1 mL do banho foi retirado e analisado por espectrofotometria UV/Vis. Calculou-se assim, para os três microbicidas nos diversos tempos, a porcentagem de microbicida desorvida (por lavagem) após o teste em relação à quantidade absorvida.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Neste capítulo, serão apresentados os resultados dos trabalhos experimentais para verificar a capacidade antimicrobiana dos microbicidas e a discussão dos mesmos.

4.1 Ataque bacteriano por plaqueamento em peles remolhadas

Neste primeiro experimento, verificou-se a ação bactericida dos microbicidas através do teste de plaqueamento. As Figuras 4.1 a 4.4 mostram o crescimento das bactérias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptomyces* sp. respectivamente na superfície das amostras de peles remolhadas após os 21 dias de experimento.

Na observação feita das amostras, verificou-se a baixa capacidade antibacteriana dos microbicidas selecionados quando aplicados no processo de remolho contra o ataque das bactérias contaminantes. Somente o microbicida formulado a base de TCMTB mostrou-se eficaz contra o ataque das bactérias *Bacillus subtilis* e *Streptomyces* sp.; todas as outras amostras apresentaram contaminações.

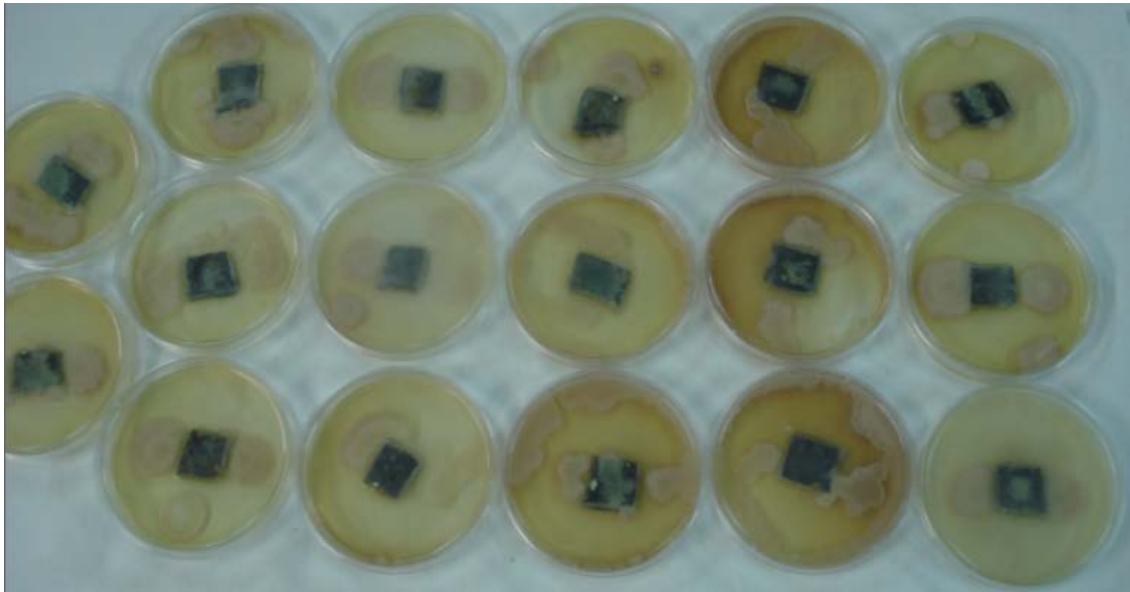


Figura 4.1: Crescimento da bactéria *Bacillus subtilis* nas amostras de peles remolhadas tratadas com microbicidas, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT+BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT

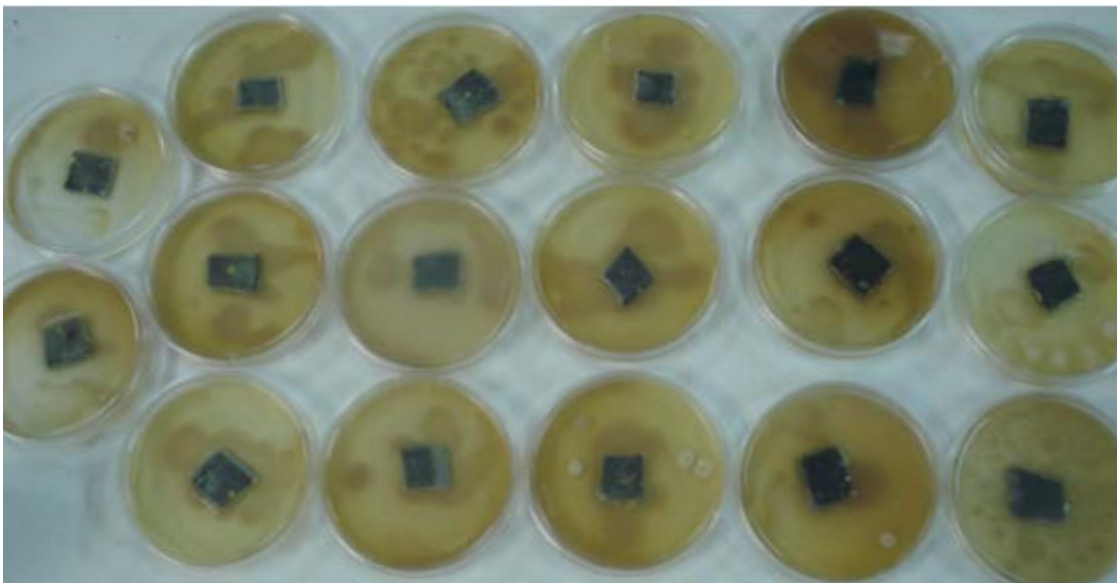


Figura 4.2: Crescimento da bactéria *Escherichia coli*, nas amostras de peles remolhadas tratadas com microbicidas, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT+BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT

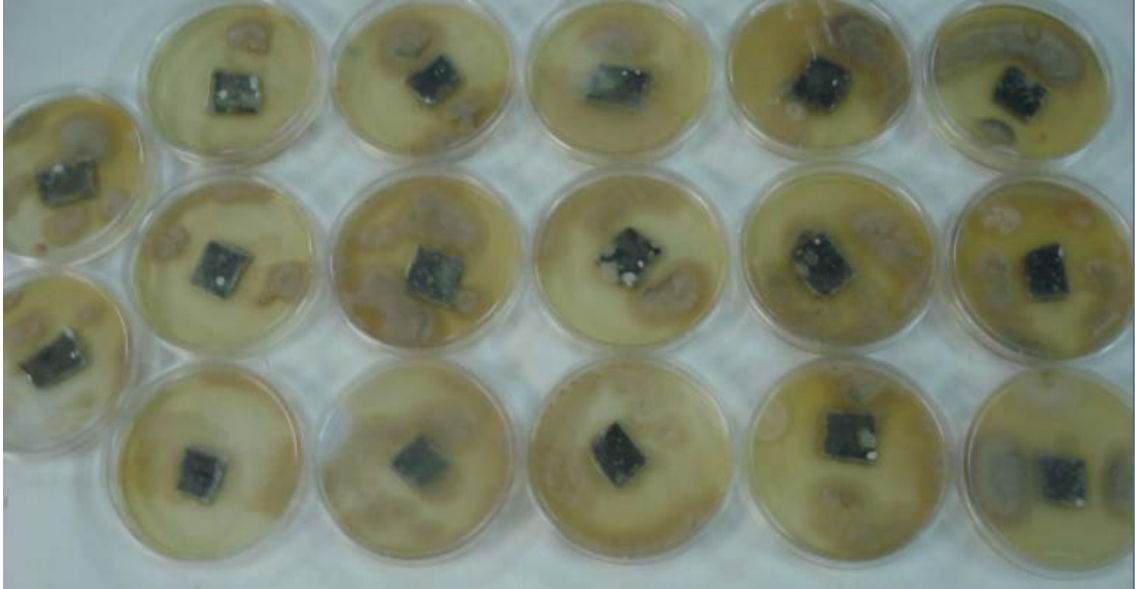


Figura 4.3: Crescimento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, nas amostras de peles remolhadas tratadas com microbicidas, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT+BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT

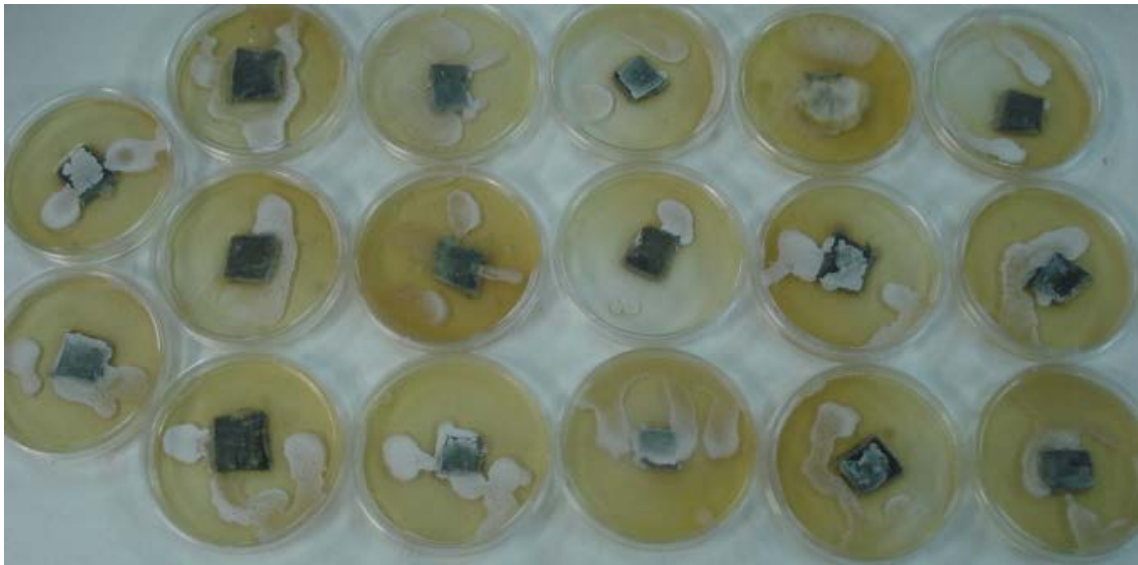


Figura 4.4: Crescimento da bactéria *Streptomyces* sp. nas amostras de peles remolhadas tratadas com microbicidas, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT+BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT

4.2 Ataque fúngico por plaqueamento

4.2.1 Em peles Piqueladas

Na Tabela 4.1 encontram-se os resultados da distância de inibição e porcentagem do crescimento dos fungos nas superfícies das amostras de pele piquelada após 28 dias de teste. As Figuras 4.5 a 4.8 mostram o crescimento dos fungos, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium herguei* e *Penicillium chrysogenum*, respectivamente, nas placas. Nestes ensaios, a distância de inibição está relacionada com a máxima distância onde não ocorre o crescimento de fungos na placa de ágar (a qual foi considerada 4,5 cm como controle) e o crescimento superficial é a porcentagem das amostras de couro que foi contaminada com fungo.

Verificou-se a baixa capacidade antifúngica dos microbicidas utilizados na etapa do píquel, quando a amostra é contaminada com *Aspergillus flavus*, pois após os 28 dias de teste todas as amostras estavam contaminadas, chegando a 100 % de superfície contaminada. Para as amostras contaminadas com os fungos *Penicillium herguei* e *Penicillium chrysogenum* todos os microbicidas mostraram-se eficientes, pois mesmo após 28 dias de teste não se observou o crescimento dos fungos. Para as amostras piqueladas contaminadas com o *Aspergillus niger*, somente o microbicida TCMTB apresentou ação antimicrobiana inibindo o crescimento do fungo.

Tabela 4.1: Distância de inibição (DI) e Crescimento superficial (CS) após 28 dias de teste, nas diferentes amostras peles piqueladas

MICROBICIDA	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Aspergillus flavus</i>		<i>Penicillium herguei</i>		<i>Penicillium chrysogenum</i>	
	DI (cm)	CS (%)	DI (cm)	CS (%)	DI (cm)	CS (%)	DI (cm)	CS (%)
Controle	0±0	100±0	0±0	100±0	0±0	35,0±4,2	0±0	88±4,9
TCMTB	4,5±0	0±0	0±0	29,5±3,5	2,8±1,7	0±0	4,5±0	0±0
Isotiazolína	0 ±0	57,5±3,5	0±0	100±0	0,7±0,1	0±0	0±0	0±0
OIT + BMC/óleo	0±0	65,0±7,1	0±0	100±0	2,3±0,2	0±0	2,7±0,3	0±0
OIT + BMC/água	0 ±0	32,5±3,6	0±0	100±0	4,5±0	0±0	2,9±0,2	0±0
OIT	0 ±0	88,5±2,2	0±0	100±0	0±0	0±0	1,8±0,2	0±0

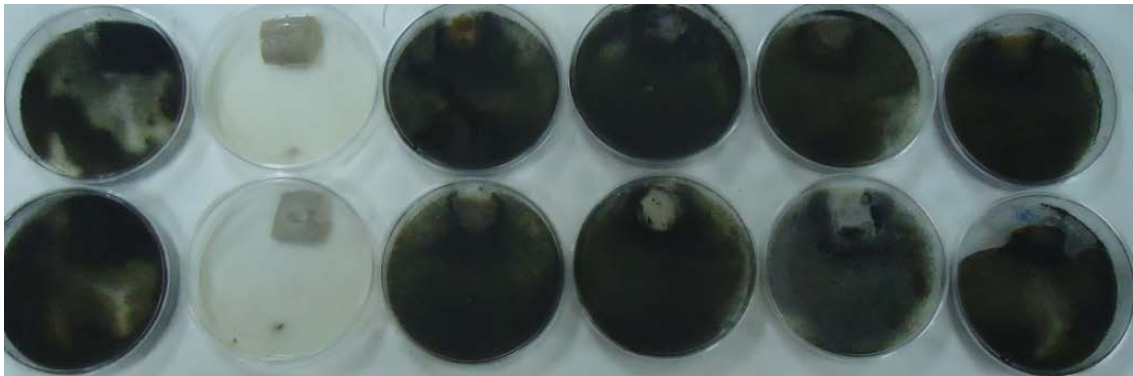


Figura 4.5: Crescimento do fungo *Aspergillus niger* nos ensaios em duplicata (amostra de cima com a amostra de baixo) em peles piqueladas, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT

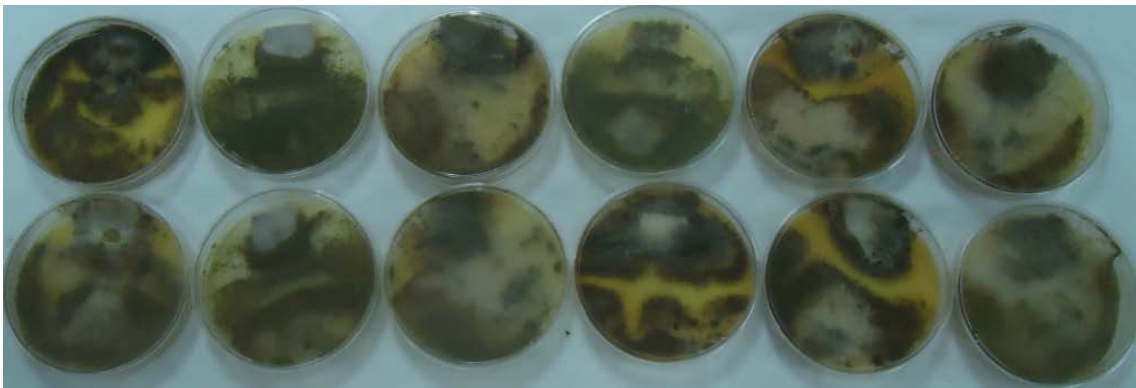


Figura 4.6: Crescimento do fungo *Aspergillus flavus* nos ensaios em duplicata (amostra de cima com a amostra de baixo) em peles piqueladas, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT

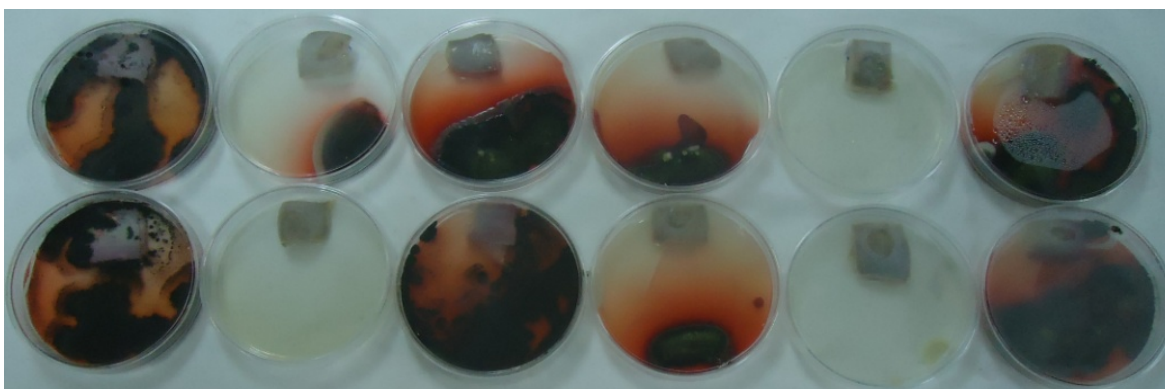


Figura 4.7: Crescimento do fungo *Penicillium herquei* nos ensaios em duplicata (amostra de cima com a amostra de baixo) em peles piqueladas, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT

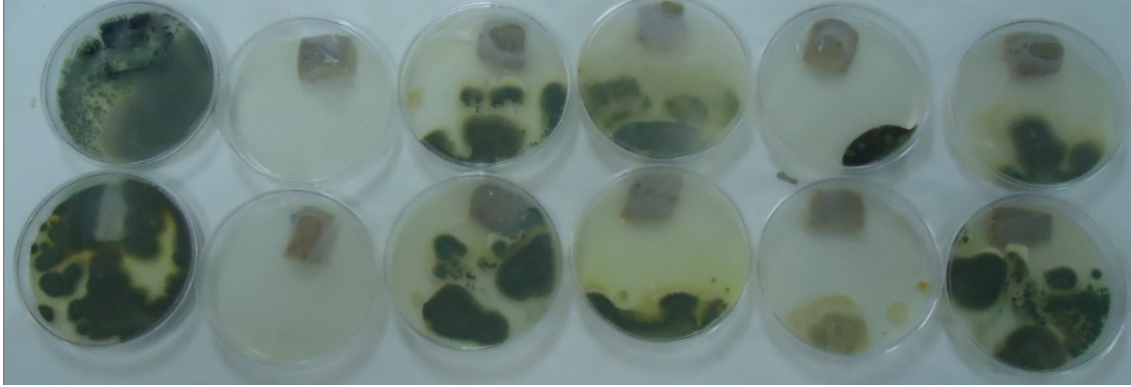


Figura 4.8: Crescimento do fungo *Penicillium chrysogenum* nos ensaios em duplicata (amostra de cima com a amostra de baixo) em peles piqueladas, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolína, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT

As Figuras 4.9 a 4.12 mostram a evolução da distância de inibição para o teste de plaqueamento com peles piqueladas, durante os 28 dias do experimento. A não existência de barras nos gráficos destas figuras significa que a distância entre a amostra e o crescimento do fungo foi zero.

Maiores distâncias de inibição foram observadas para o microbicida TCMTB contra o ataque dos fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium chrysogenum*. O fungo *Aspergillum flavus* mostrou resistência contra todos os microbicidas testados. Após sete dias de experimento a distância de inibição para amostras de pele piqueladas contaminadas com este fungo foi igual a zero, este valor nas figuras representa a inexistência de barras. Para o fungo *Penicillium herguei*, maiores distâncias de inibição foram observadas com a pele piquelada tratada com o microbicida OIT+BMC/água.

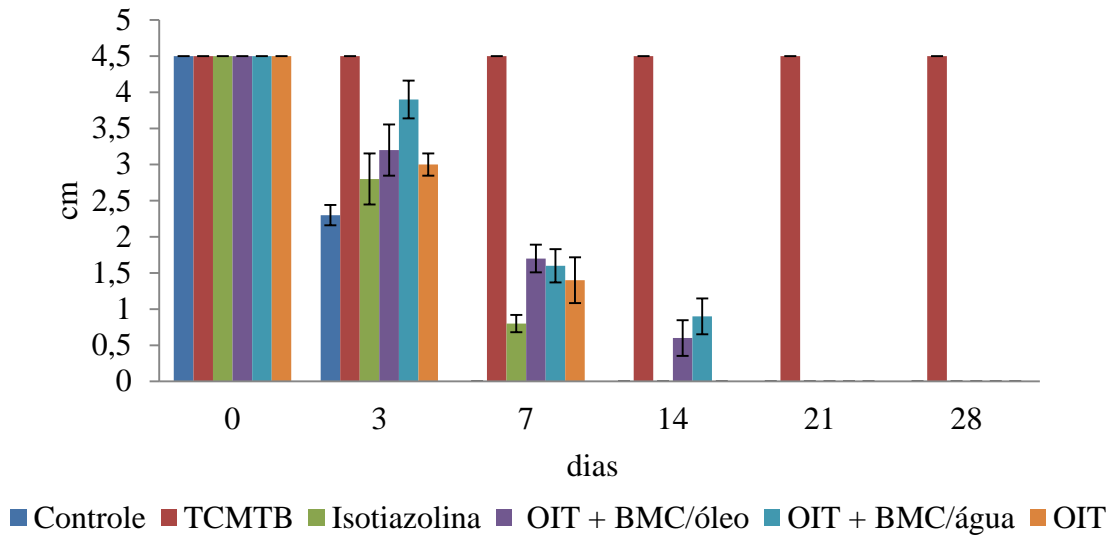


Figura 4.9: Diminuição da distância de inibição da pele piquelada contaminada com *Aspergillus niger*

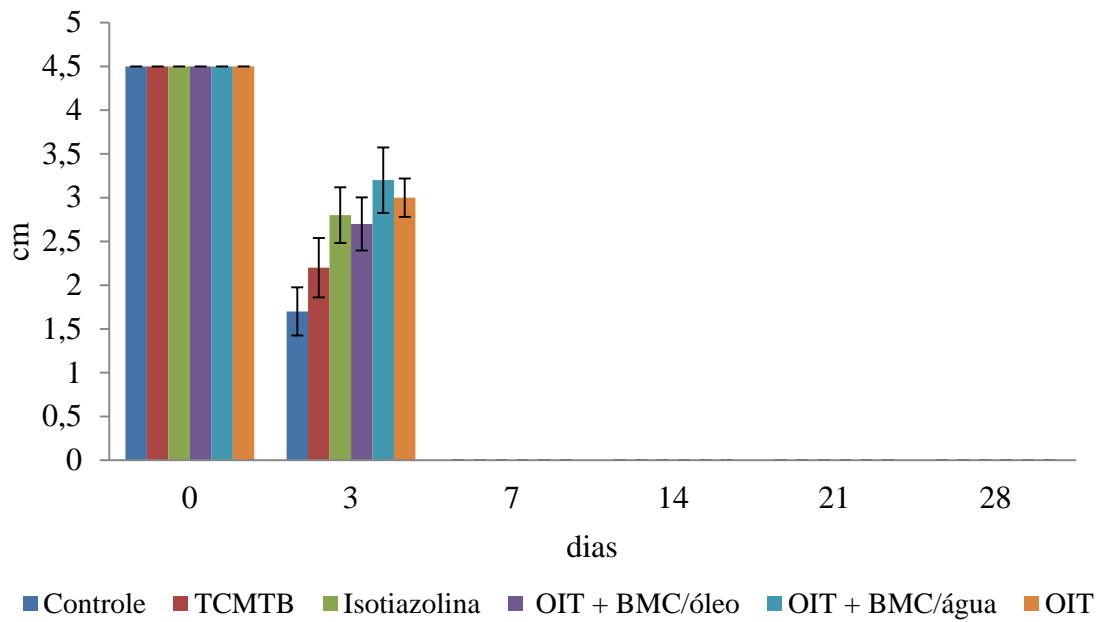


Figura 4.10: Diminuição da distância de inibição da pele piquelada contaminada com *Aspergillus flavus*

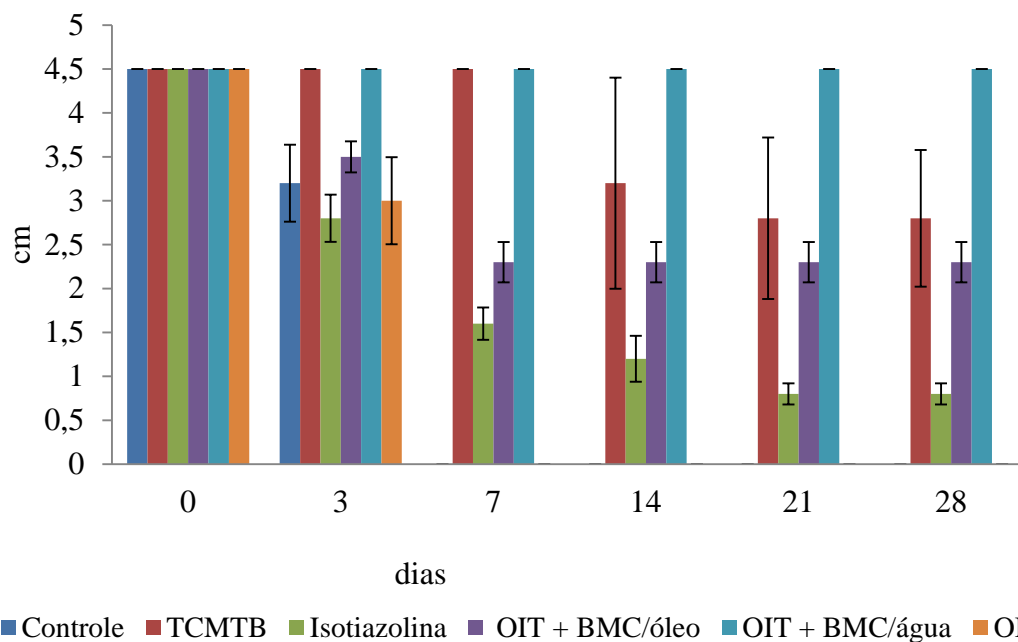


Figura 4.11: Diminuição da distância de inibição da pele piquelada contaminada com *Penicillium hergueli*

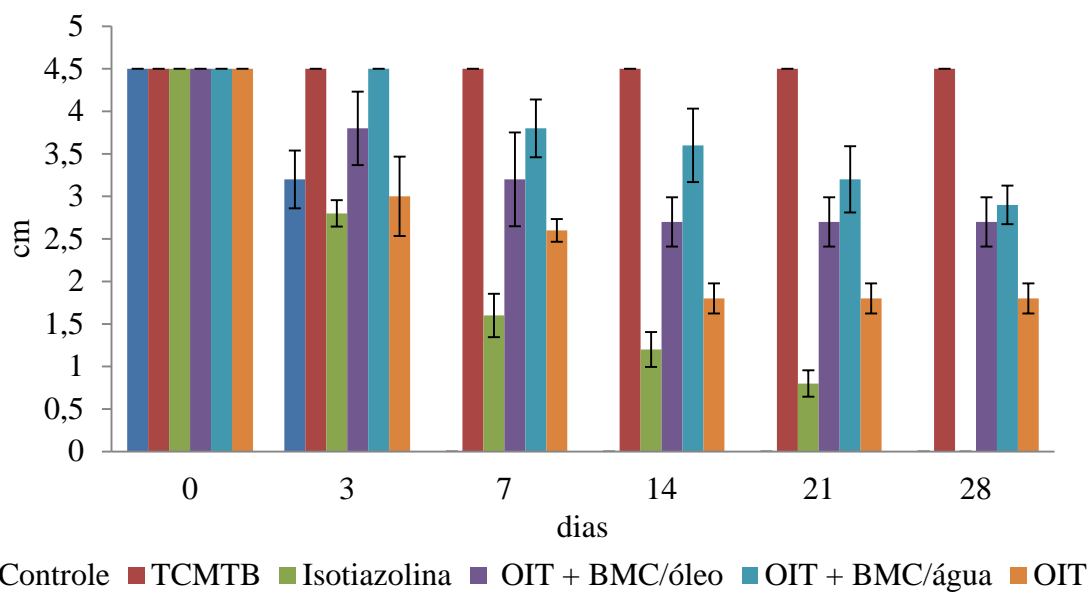


Figura 4.12: Diminuição da distância de inibição da pele piquelada contaminada com *Penicillium chrysogenum*

4.2.2 Em couros wet-blue

Para curtimento com cromo e adição de 0,2 % de microbicida, na Tabela 4.2 encontram-se os resultados médios para a distância de inibição e a porcentagem de crescimento dos fungos nas superfícies dos ensaios feitos em duplicata das amostras de couro wet-blue mostradas nas Figuras 4.13 a 4.16, após 28 dias de teste. As Figuras mostram o crescimento dos diferentes fungos, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium herguei* e *Penicillium chrysogenum* nas placas.

Quanto mais próximos de 4,5 cm forem os valores da distância de inibição, maior será a proteção fornecida pelo microbicida, porém, uma elevada distância de inibição indica que o produto pode migrar do couro tratado para o meio, o que é uma propriedade indesejável do microbicida.

De acordo com a Tabela e as Figuras, verifica-se que a proteção antifúngica fornecida por dois dos microbicidas (TCMTB e OIT+BMC/água) foi notável, pois não foi observado o crescimento dos fungos testados nas superfícies destas amostras. Porém o microbicida OIT+BMC/água apresentou uma distância de inibição maior que o TCMTB. Uma maior resistência do fungo *Aspergillus flavus* foi observada em relação a três microbicidas utilizados, Isotiazolina, OIT+BMC/óleo e OIT.

Tabela 4.2: Distância de inibição (DI) e Crescimento superficial (CS) após 28 dias de teste, das amostras de couro wet-blue

MICROBICIDA	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Aspergillus flavus</i>		<i>Penicillium herguei</i>		<i>Penicillium chrysogenum</i>	
	DI (cm)	CS (%)	DI (cm)	CS(%)	DI (cm)	CS (%)	DI (cm)	CS(%)
Controle	0±0	100±0	0±0	100±0	0±0	62,5±6,4	0±0	59±11,3
TCMTB	0,1±0,1	0±0	0±0	0±0	2,5±0,2	0±0	2,8±0,3	0±0
Isotiazolina	0,2±0,1	0±0	0±0	30±11,3	2,2±0,4	0±0	2,5±0,1	0±0
OIT + BMC/óleo	0,2±0,1	3,5±0,7	0±0	68,5±2,8	4,5±0	0±0	4,5±0	0±0
OIT + BMC/água	0,9±0,2	0±0	3,8±0,2	0±0	4,5±0	0±0	4,5±0	0±0
OIT	0±0	0±0	0±0	49±4,2	3,1±0,2	0±0	2,6±0,1	0±0
PCMC	0±0	49,5±3,5	0±0	93±9,9	0±0	0±0	2,2±0,2	0±0



Figura 4.13: Crescimento do fungo *Aspergillus niger* nos ensaios em duplicata (amostra de cima com a de baixo) em wet-blue. Da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água, OIT e PCMC

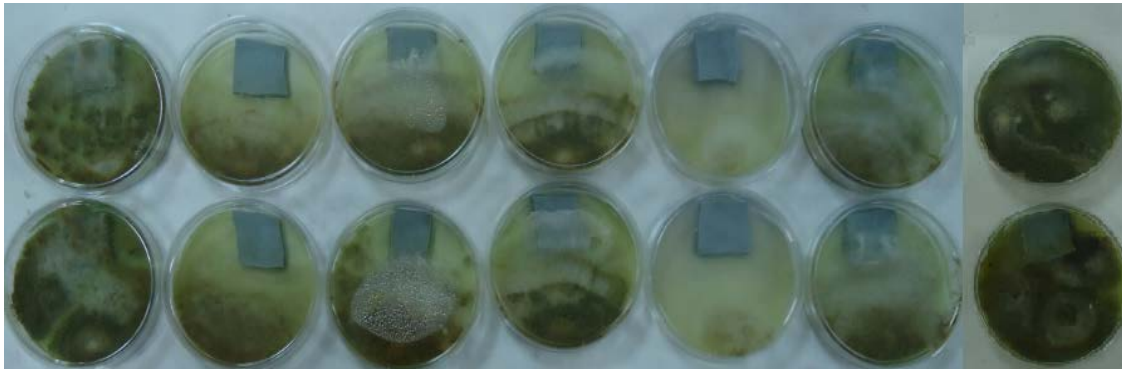


Figura 4.14: Crescimento do fungo *Aspergillus flavus* nos ensaios em duplicata (amostra de cima com a de baixo) em wet-blue. Da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água, OIT e PCMC

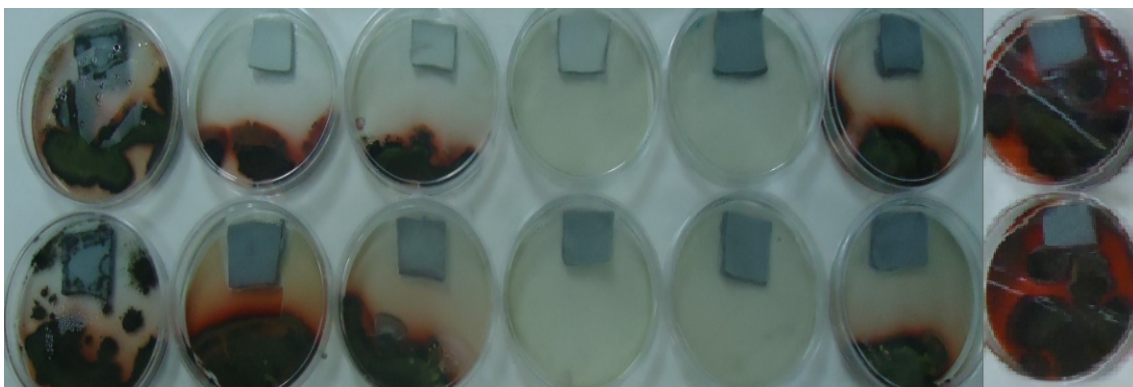


Figura 4.15: Crescimento do fungo *Penicillium herguei* nos ensaios em duplicata (amostra de cima com a de baixo) em wet-blue. Da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água, OIT e PCMC

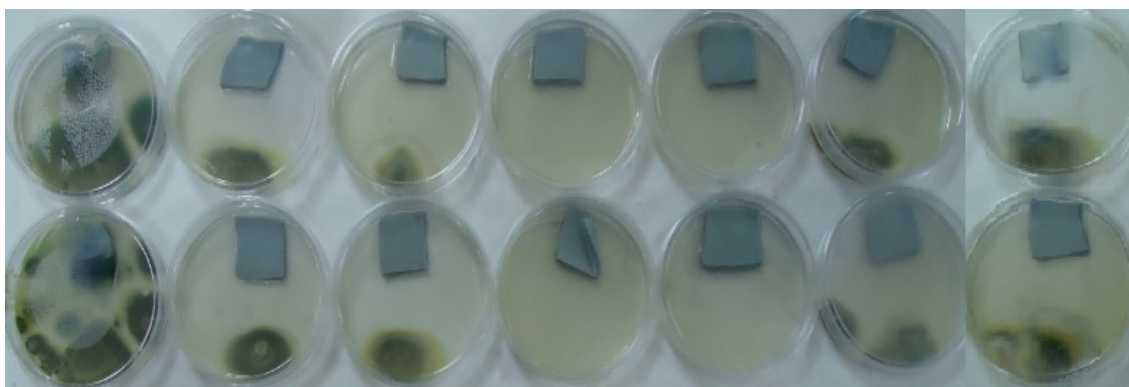


Figura 4.16: Crescimento do fungo *Penicillium chrysogenum* ensaios em duplicata (amostra de cima com a de baixo) em wet-blue. Da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água, OIT e PCMC

As Figuras 4.17 a 4.20 mostram a diminuição da distância de inibição para o teste de plaqueamento com couros wet-blue, durante os 28 dias do experimento. A não existência de barras nos gráficos destas figuras significa que a distância entre a amostra e o crescimento do fungo foi zero.

Maiores distâncias de inibição foram verificadas para *Penicillium chrysogenum*. Para os quatro fungos as distâncias de inibição se estabilizaram após 21 dias de teste para todos microbicidas.

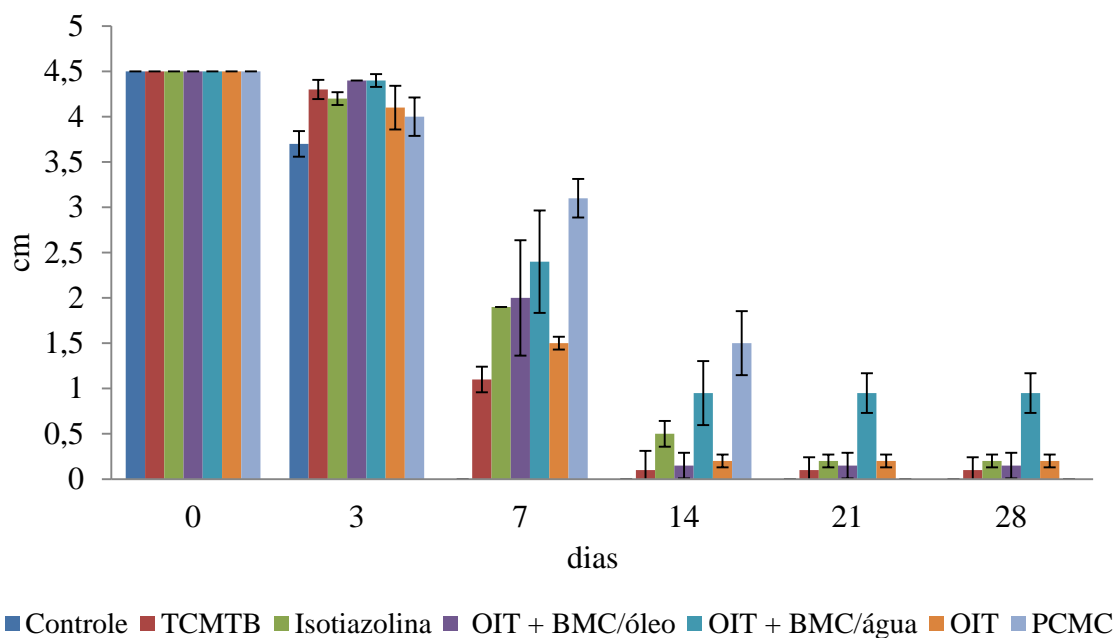


Figura 4.17: Diminuição da distância de inibição no couro wet-blue contaminado com *Aspergillus niger*

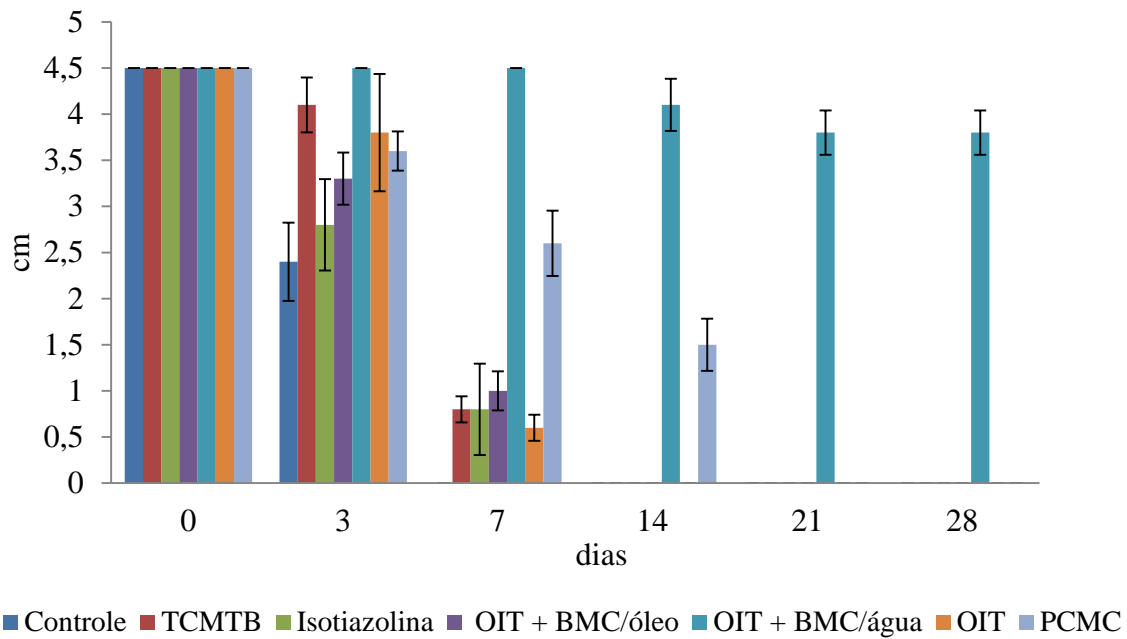


Figura 4.18: Diminuição da distância de inibição no couro wet-blue contaminado com *Aspergillus flavus*

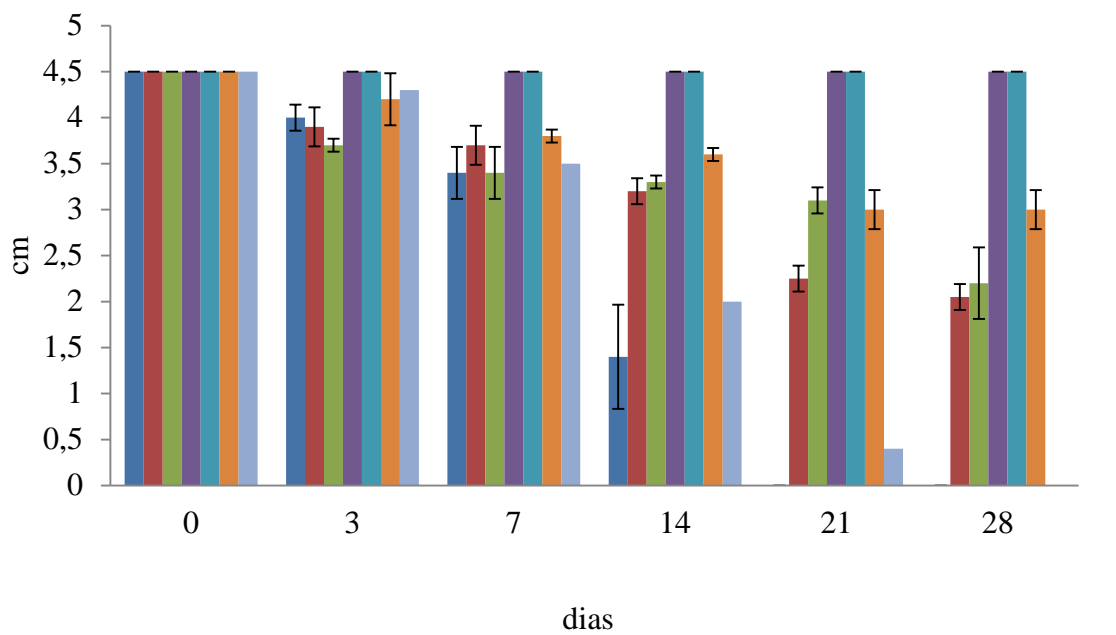


Figura 4.19: Diminuição da distância de inibição no couro wet-blue contaminado com *Penicillium herguei*

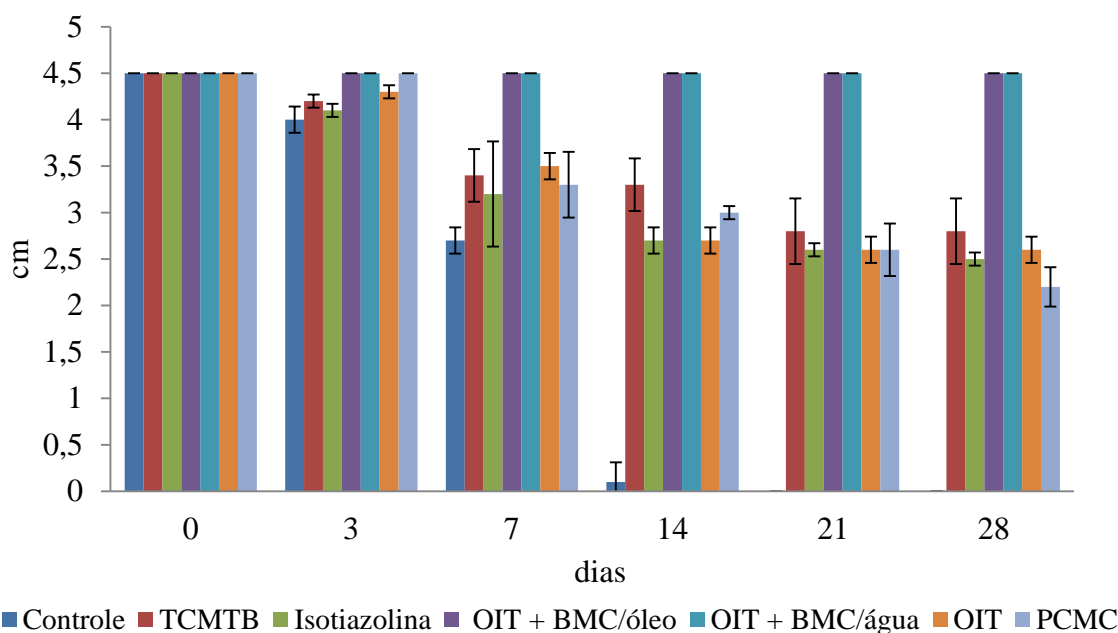


Figura 4.20: Diminuição da distância de inibição no couro wet-blue contaminado com *Penicillium chrysogenum*

As Figuras 4.21 a 4.24 mostram as imagens do teste de plaqueamento para amostras de wet-blue com duas ofertas (0,1 e 0,4 %) dos microbicidas TCMTB, OIT+BMC/água e PCMC. Este ensaio foi realizado para verificar o efeito dos produtos testados em ofertas menor e maior do que a recomendada de 0,2 %.

Observa-se nas imagens que uma oferta de 0,1 % de todos os microbicidas, quando as peles são contaminadas com *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*, não é eficiente para a proteção do couro contra o ataque destes fungos. Para as peles contaminadas com *Penicillium herguei* e *Penicillium chrysogenum*, somente o microbicida à base de PCMC não mostrou uma proteção antifúngica nesta mesma concentração.

Quando os couros foram tratados com uma oferta de 0,4 % todos os microbicidas se mostraram eficientes, porém os microbicidas TCMTB e OIT+BMC/água apresentaram uma grande distância de inibição, indicando que não há necessidade de oferta maior do que a recomendada.

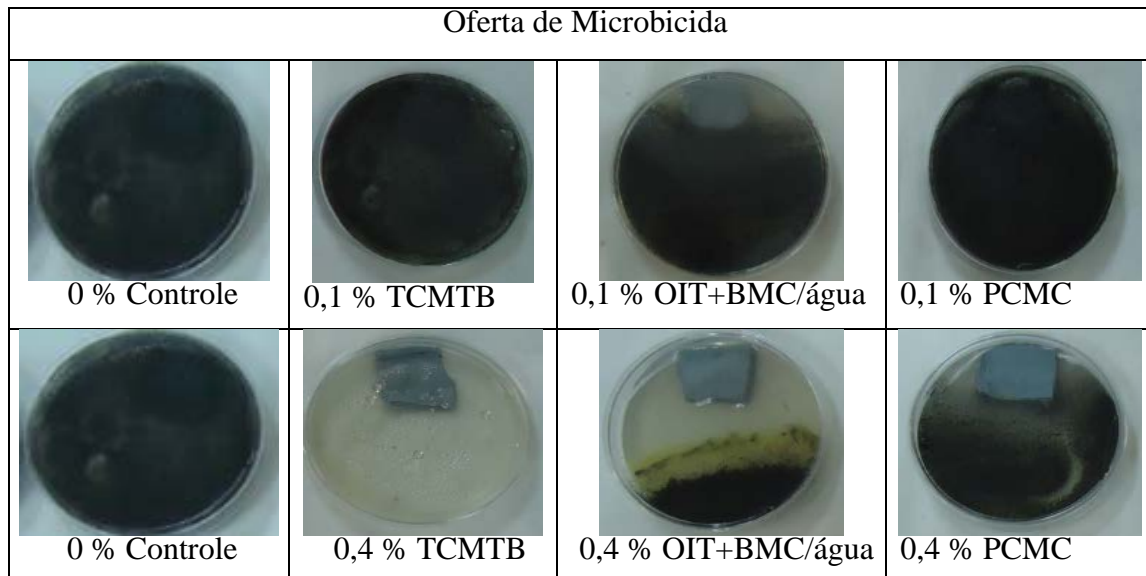


Figura 4.21: Crescimento do fungo *Aspergillus niger* nas amostras de couro wet-blue tratadas com 0,1 e 0,4 % dos microbicidas

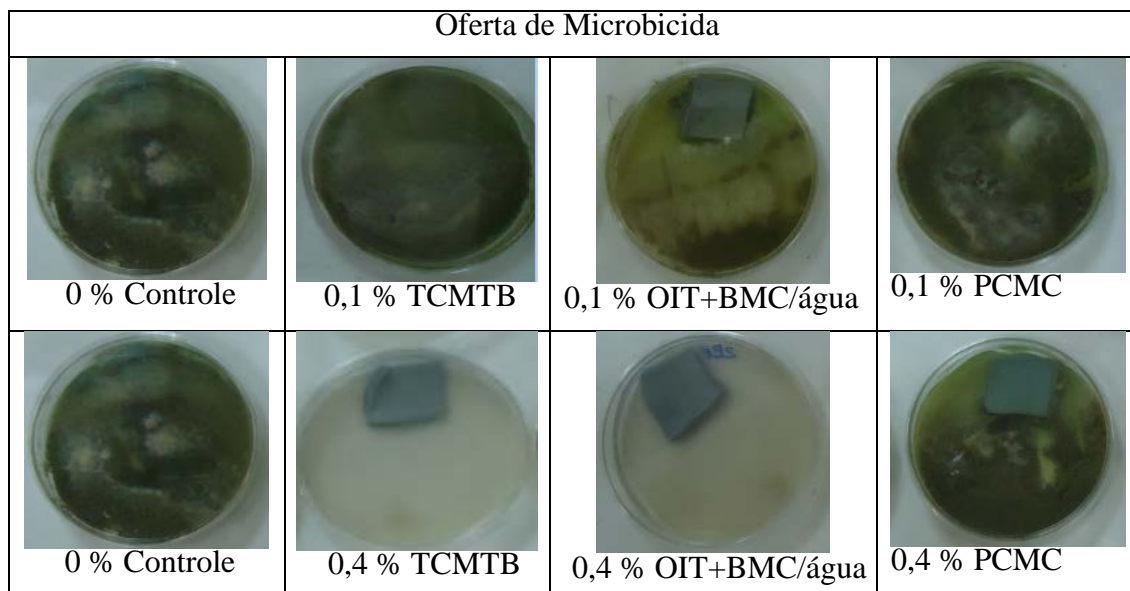


Figura 4.22: Crescimento do fungo *Aspergillus flavus* nas amostras de couro wet-blue tratadas com 0,1 e 0,4 % dos microbicidas

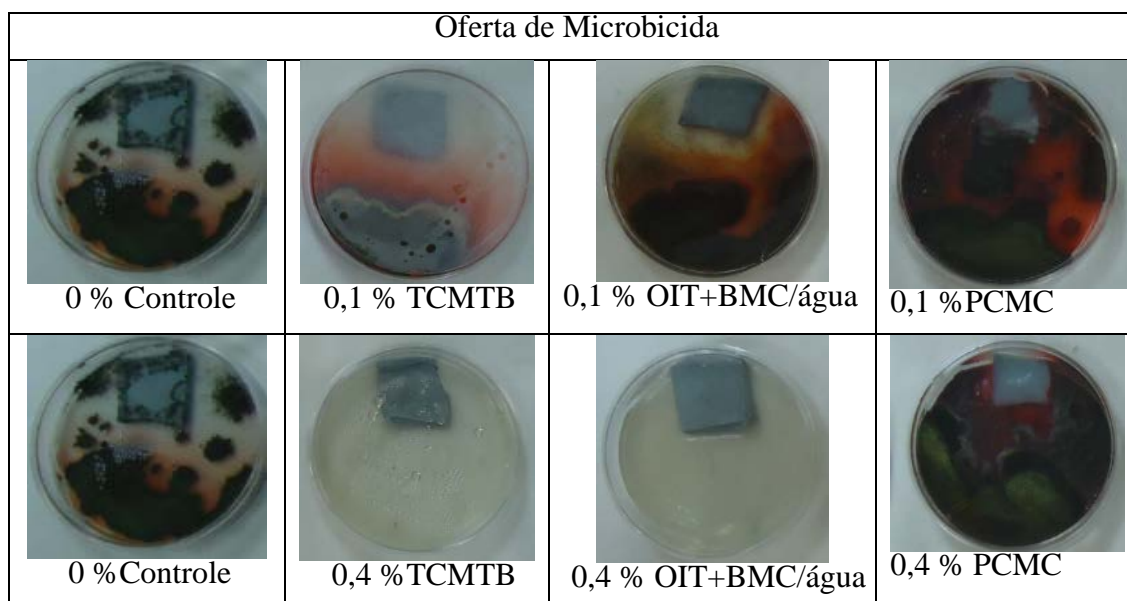


Figura 4.23: Crescimento do fungo *Penicillium hergeui* nas amostras de couro wet-blue tratadas com 0,1 e 0,4 % dos microbicidas

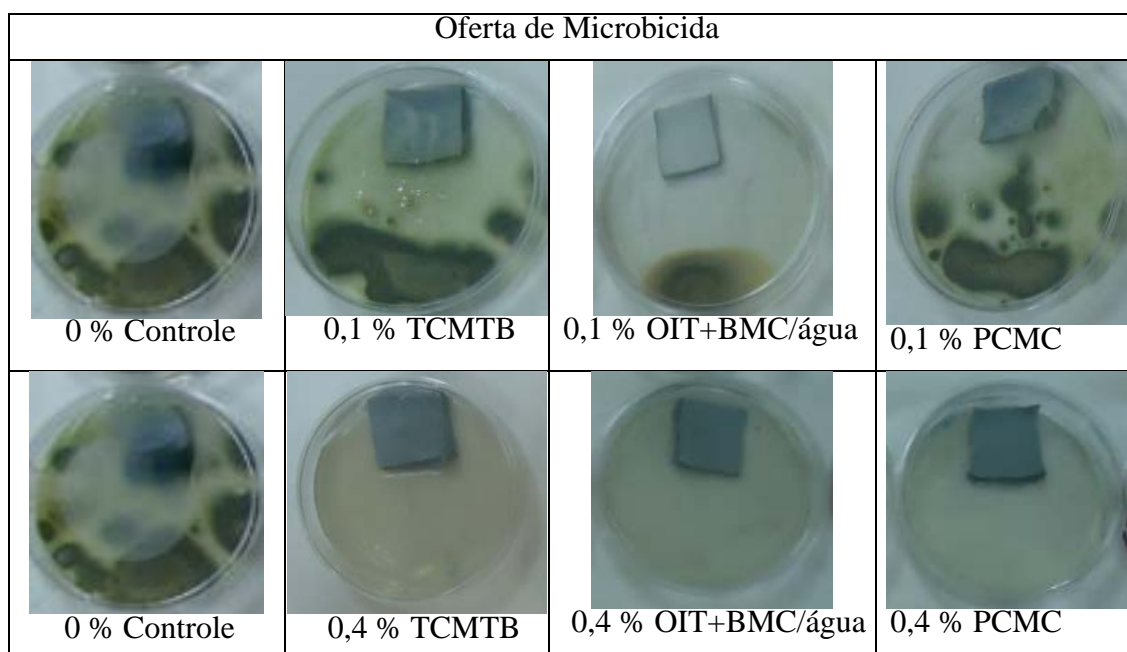


Figura 4.24: Crescimento do fungo *Penicillium chrysogenum* nas amostras de couro wet-blue tratadas com 0,1 e 0,4 % dos microbicidas

4.2.3 Em couros curtidos com tanino vegetal

Para o curtimento com tanino vegetal e adição de 0,2 % de microbicida, na Tabela 4.3 encontram-se os resultados da distância de inibição e porcentagem do crescimento dos fungos nas placas. As Figuras 4.25 a 4.28 mostram o crescimento dos fungos.

Verificou-se baixa capacidade antifúngica dos microbicidas utilizados quando o couro de curtimento vegetal foi contaminado com *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*, pois após os 28 dias de teste todas as amostras já estavam contaminadas, algumas chegando a superfície 100 % contaminada. Para os couros contaminados com o fungo *Penicillium herguei* em três amostras (OIT+BMC/água, OIT+BMC/óleo e OIT) não foi observado o crescimento na superfície. Já para as amostras contaminadas com *Penicillium chrysogenum* os microbicidas que se mostraram eficientes, durante o tempo de realização do experimento, foram TCMTB, OIT+BMC/óleo e OIT.

Tabela 4.3: Distância de inibição (DI) e Crescimento superficial (CS) após 28 dias de teste, das amostras de couro com tanino vegetal

MICROBICIDA	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Aspergillus flavus</i>		<i>Penicillium herguei</i>		<i>Penicillium chrysogenum</i>	
	DI (cm)	CS (%)	DI (cm)	CS (%)	DI (cm)	CS (%)	DI (cm)	CS (%)
Controle	0±0	100±0	0±0	100±0	0±0	100±0	0±0	50±2,8
TCMTB	0±0	74±2,8	0±0	100±0	0±0	6,5±5	1,6±0,6	0±0
Isotiazolína	0±0	92,5±4,9	0±0	100±0	0,3±0,4	3,5±5	0,6±0,3	5±2,6
OIT + BMC/óleo	0±0	13,5±2,1	0±0	100±0	2,4±0,1	0±0	2,0±0,1	0±0
OIT + BMC/água	0±0	88±11,3	0±0	100±0	2,1±0,1	0±0	1,9±0,1	0±0
OIT	0±0	77,5±2,1	0±0	100±0	0,1±0,4	0±0	0,8±0,1	1,5±2,1

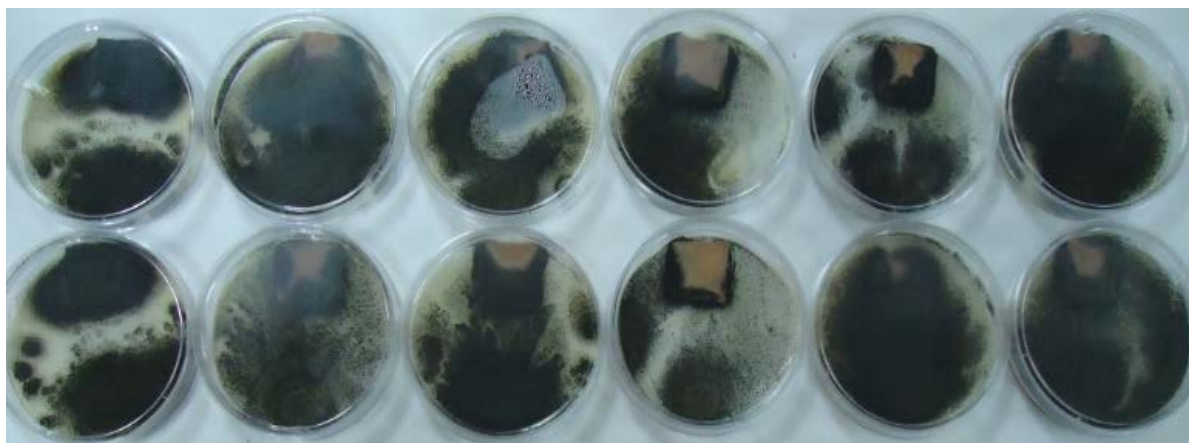


Figura 4.25: Crescimento do fungo *Aspergillus niger* nos ensaios em duplicata (amostra de cima com a amostra de baixo) em couro de curtimento vegetal, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolína, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT

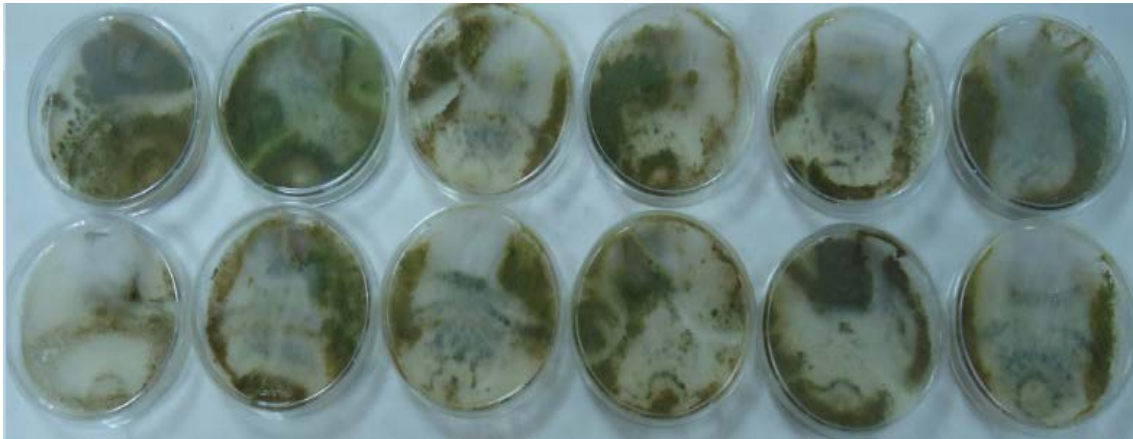


Figura 4.26: Crescimento do fungo *Aspergillus flavus* nos ensaios em duplicata (amostra de cima com a amostra de baixo) em couro de curtimento vegetal, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT

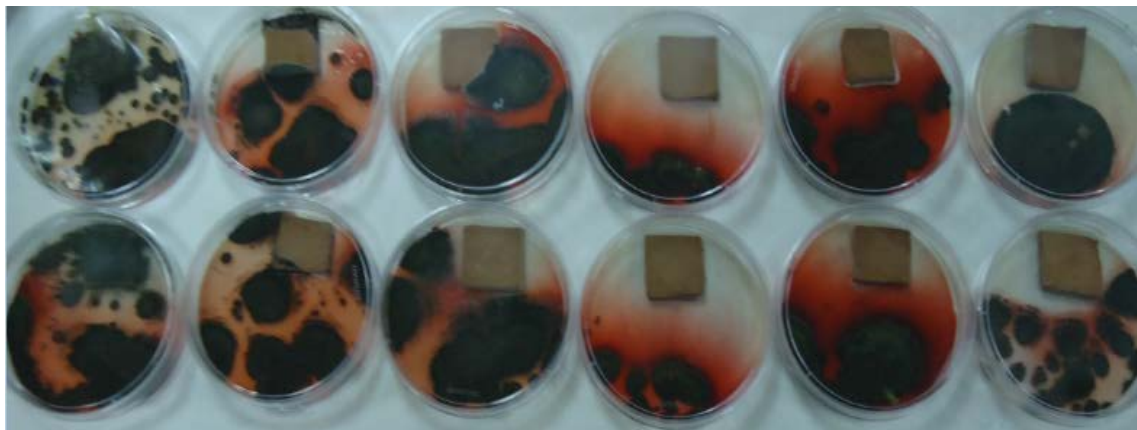


Figura 4.27: Crescimento do fungo *Penicillium herguei* nos ensaios em duplicata (amostra de cima com a amostra de baixo) em couro de curtimento vegetal, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT

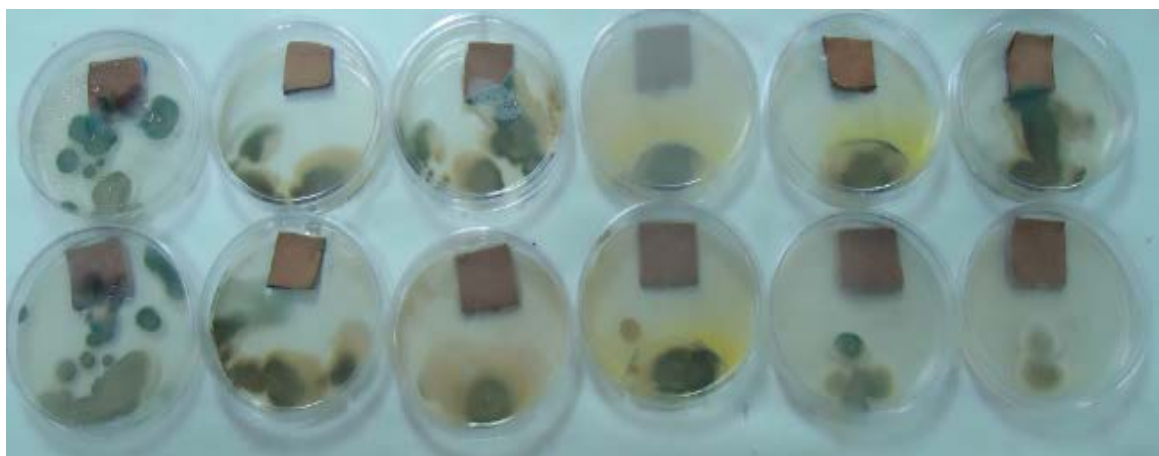


Figura 4.28: Crescimento do fungo *Penicillium chrysogenum* nos ensaios em duplicata (amostra de cima com a amostra de baixo) em couro de curtimento vegetal, da esquerda para direita: Controle, TCMTB, Isotiazolina, OIT + BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT

As Figuras 4.29 a 4.32 mostram a diminuição da distância de inibição para o teste de plaqueamento com couros curtidos com tanino vegetal, durante os 28 dias do experimento. A não existência de barras nos gráficos destas figuras significa que a distância entre a amostra e o crescimento do fungo foi zero.

As distâncias de inibição contra as diferentes espécies de fungos diminuíram com o passar do tempo para todas as estirpes. Para amostras contaminadas com *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* a distância de inibição chegou a 0 cm em 14 dias de teste. Já para o *Penicillium herguei* e *Penicillium chrysogenum* as distâncias de inibição se tornaram estáveis em 21 dias do início do experimento.

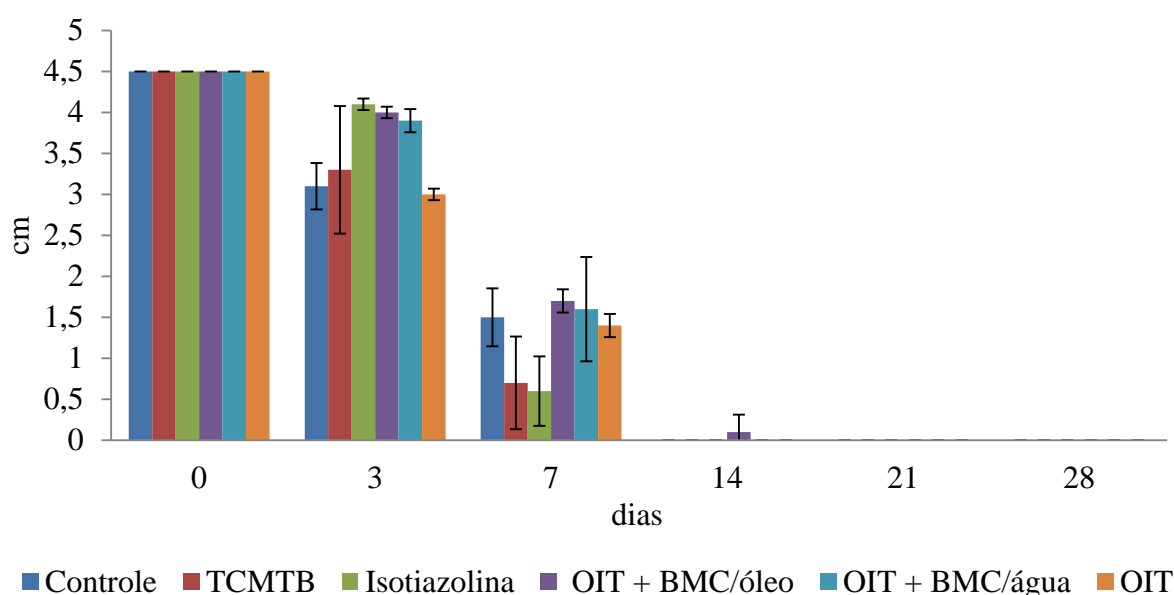


Figura 4.29: Diminuição da distância de inibição em couros de curtimento vegetal contaminados com *Aspergillus niger*

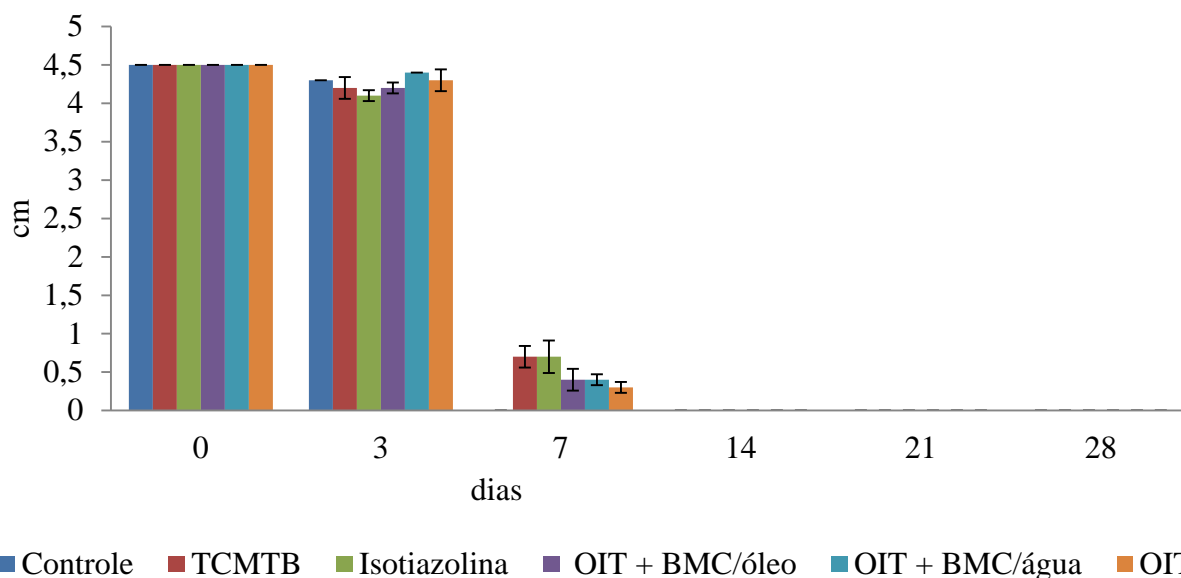


Figura 4.30: Diminuição da distância de inibição em couros de curtimento vegetal contaminados com *Aspergillus flavus*

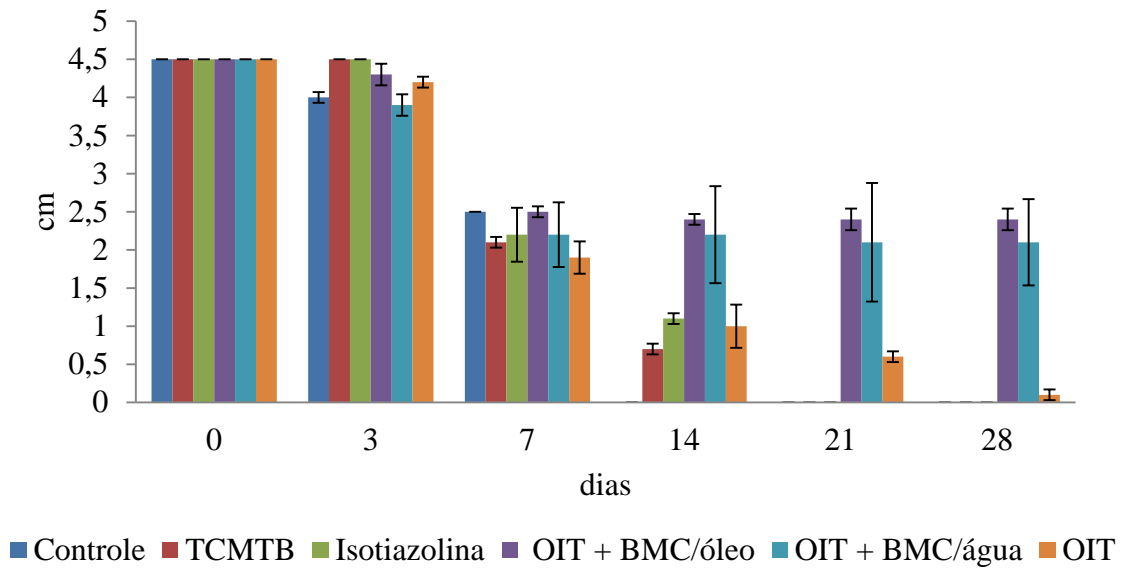


Figura 4.31: Diminuição da distância de inibição em couros de curtimento vegetal contaminados com *Penicillium hergueli*

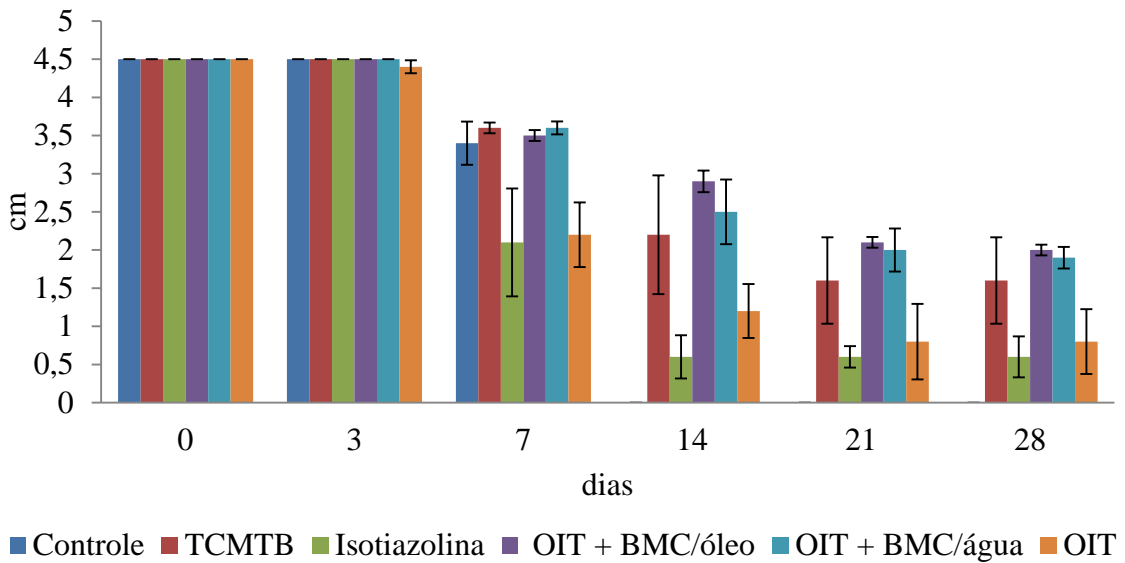


Figura 4.32: Diminuição da distância de inibição em couros de curtimento vegetal contaminados com *Penicillium chrysogenum*

As Figuras 4.33 a 4.36 mostram as imagens do teste de plaqueamento utilizando amostras de couro de curtimento vegetal curtidas com duas ofertas (0,5 e 0,75 %) dos microbicidas TCMTB e OIT+BMC/água.

Nota-se que mesmo uma oferta de 0,75 % do microbicida TCMTB, apresenta baixa ação fungicida, pois não houve inibição do crescimento dos fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Penicillium chrysogenum* nas amostras de couro atinado. Já para o microbicida a base

de OIT+BMC/água uma oferta de 0,5 % impediu o crescimento dos fungos *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium herguei*.

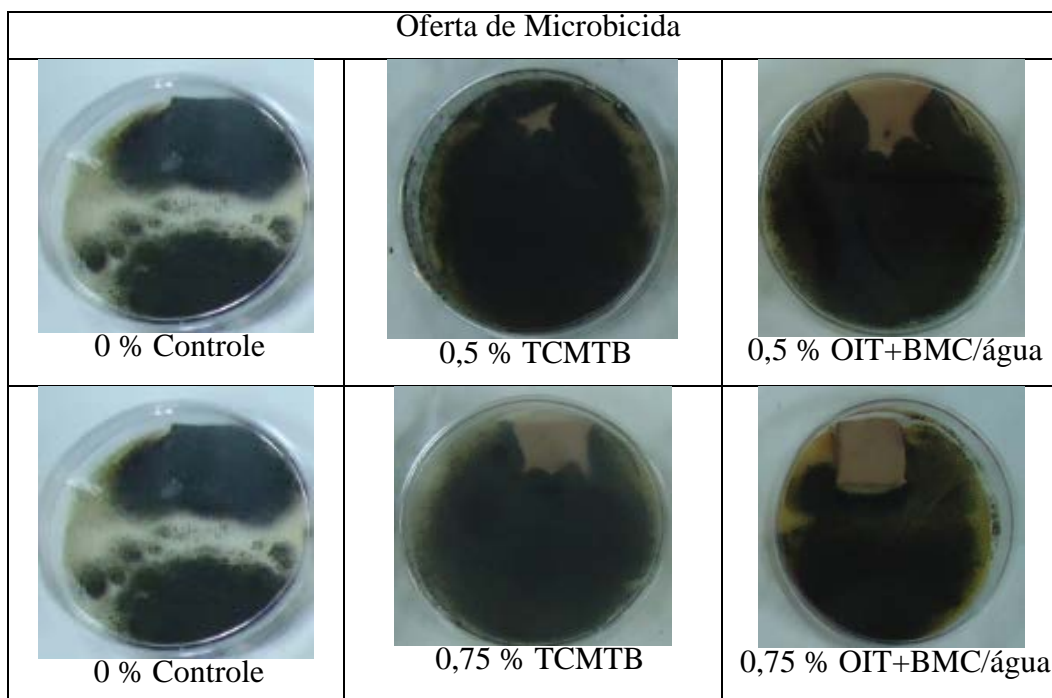


Figura 4.33: Crescimento do fungo *Aspergillus niger* nas amostras de couro de curtimento vegetal tratadas com ofertas de 0,5 e 0,75 % dos microbicidas

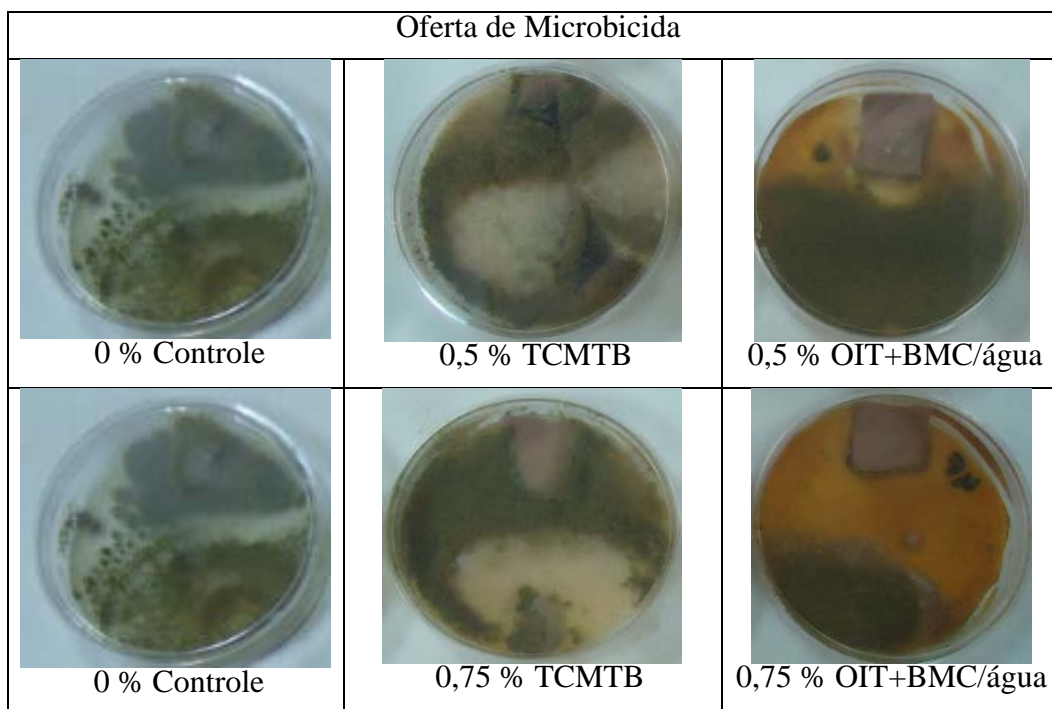


Figura 4.34: Crescimento do fungo *Aspergillus flavus* nas amostras de couro de curtimento vegetal tratadas com ofertas de 0,5 e 0,75 % dos microbicidas

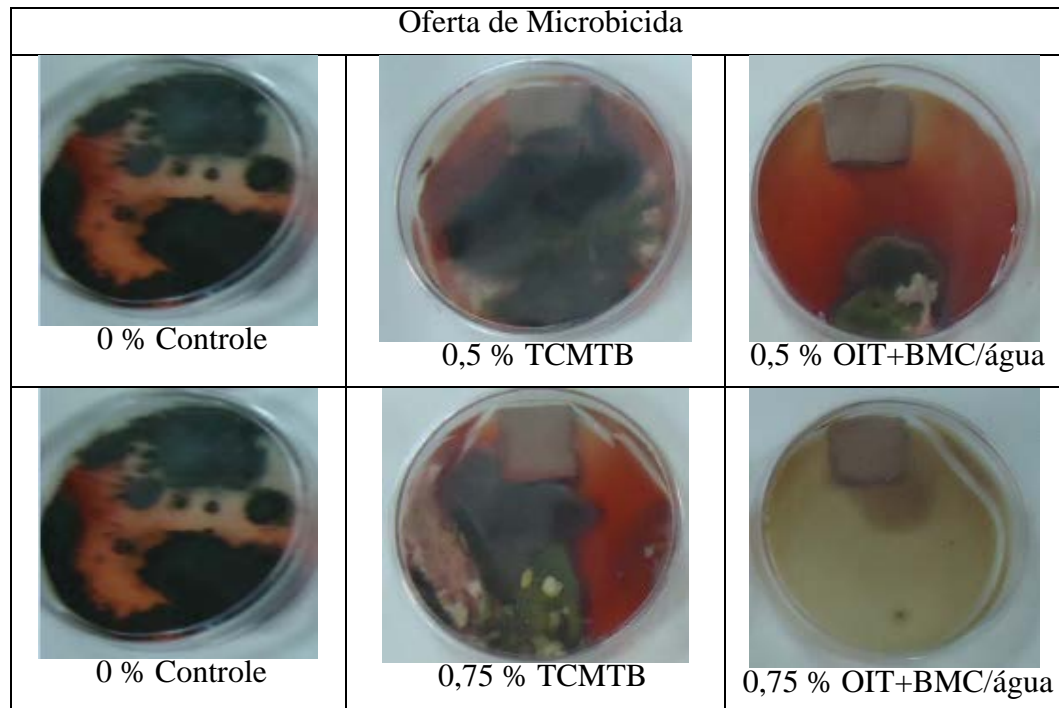


Figura 4.35: Crescimento do fungo *Penicillium herguei* nas amostras de couro de curtimento vegetal tratadas com ofertas de 0,5 e 0,75 % dos microbicidas

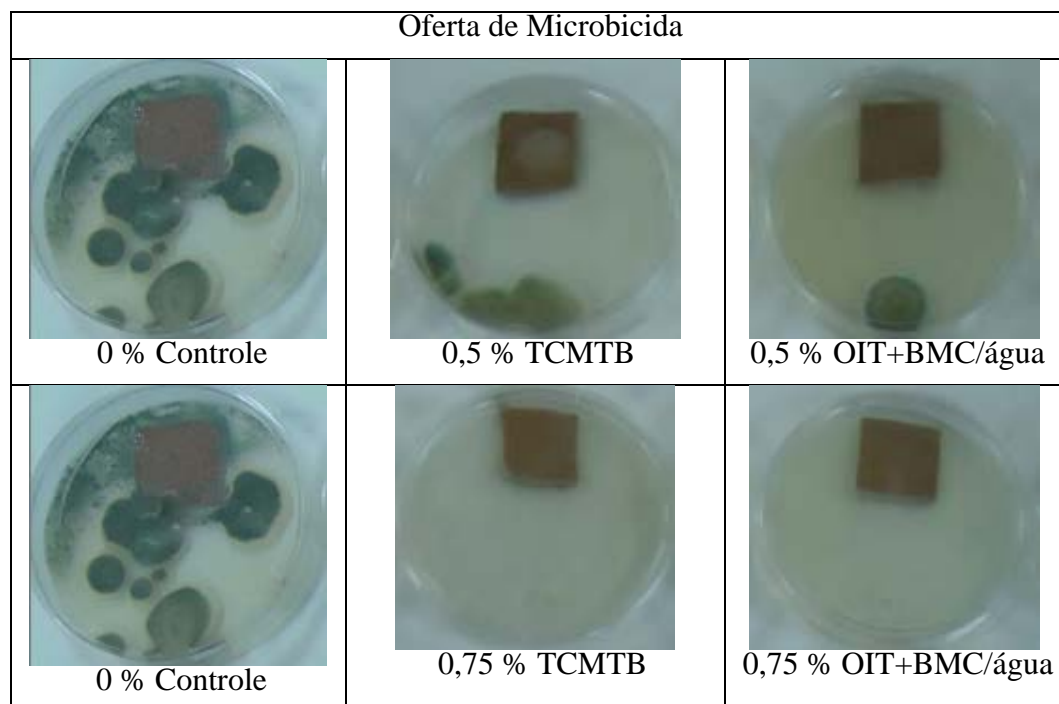


Figura 4.36: Crescimento do fungo *Penicillium chrysogenum* nas amostras de couro de curtimento vegetal tratadas com ofertas de 0,5 e 0,75 % dos microbicidas

4.3 Câmara Tropical

Encontram-se na Tabela 4.4 os resultados do experimento realizado na câmara tropical, após 28 dias de teste onde o crescimento do fungo nas amostras foi verificado e quantificado.

Tabela 4.4: Contaminação superficial dos couros no teste em câmara tropical

Microbicida	Área contaminada (%)			
	Couro wet-blue		Couro curtido com tanino vegetal	
	Flor	Carnal	Flor	Carnal
Controle	70,0±3,53	85,0±3,36	80,0±4,24	90,0±2,82
TCMTB	0±0	0±0	14,5±4,03	25,5±2,75
Isotiazolina	0±0	0±0	39,5±3,01	71,0±4,24
OIT + BMC/óleo	0±0	0±0	40,5±6,36	45,0±4,06
OIT + BMC/água	0±0	0±0	20,0±3,53	34,5±2,12
OIT	0±0	0±0	80,5±4,94	90,0±1,23

Como esperado, mais da metade das áreas das amostras dos couros wet-blue e curtidos com tanino vegetal, utilizadas como controle, foram contaminadas com *Aspergillus niger*. Os couros wet-blue tratados com microbicidas permaneceram sem a presença de fungo durante os 28 dias de teste. Já as cinco amostras com tanino vegetal tratadas com microbicidas apresentaram crescimento de fungos, demonstrando uma baixa capacidade antifúngica dos microbicidas estudados, quando aplicados neste tipo de couro, para uma mesma dosagem quando usada em couro wet-blue.

4.4 Processo de biodeterioração em solo

Este teste foi realizado para verificar a perda de massa de couros curtidos com cromo e com tanino vegetal quando os mesmos foram expostos a diferentes microrganismos.

A Tabela 4.5 mostra as porcentagens de massa das amostras de couros wet-blue e curtidos com tanino vegetal, perdidas pelo ataque de diferentes microrganismos após 45 dias de teste.

Tabela 4.5: Perda de massa das amostras submetidas ao processo de biodeterioração em solo

Microbicida	Perda de massa (%)	
	Couro wet-blue	Couro curtido com tanino vegetal
Controle	14,33	22,65
TCMTB	6,82	14,29
Isotiazolina	8,47	10,98
OIT + BMC/óleo	7,71	14,44
OIT + BMC/água	3,73	17,02
OIT	6,34	14,93

Nota-se uma maior perda de massa por parte dos couros curtidos com tanino vegetal principalmente para o couro tratado sem adição de microbicida utilizado como controle, o que indica que estes couros são mais suscetíveis ao ataque de microrganismos, quando tratados com uma mesma oferta de microbicida que wet-blue.

4.5 Ensaio de tração no couro

Nas Tabelas 4.6 e 4.7, são apresentados os resultados das análises de resistência físico-mecânica nos couros curtidos com cromo e com tanino vegetal incubadas na câmara tropical e contaminadas por *Aspergillus niger*.

Para as amostras de couro wet-blue, somente a amostra controle estava contaminada com o fungo *Aspergillus niger*, para as amostras curtidas com tanino vegetal, todas foram contaminadas com *Aspergillus niger*. Para melhor comparação entre amostras contaminadas e não contaminadas, para o couro curtido com tanino vegetal foi testada uma amostra não exposta em câmara tropical (amostra não contaminada).

Tabela 4.6: Tensão de ruptura dos couros wet-blue e com tanino vegetal

Microbicida	Tensão de ruptura (N / mm ²)	
	Couro wet-blue	Couro curtido com tanino vegetal
Controle	11,39±1,37	7,16±0,11
TCMTB	14,55±3,33	7,45±0,32
Isotiazolina	14,87±1,08	8,01±0,22
OIT + BMC/óleo	13,71±2,25	9,61±0,44
OIT + BMC/água	17,23±1,63	9,20±0,06
OIT	16,48±3,43	9,73±1,43
Amostra não contaminada atanada		11,37±1,24

Tabela 4.7: Ensaio de alongamento à ruptura dos couros wet-blue e com tanino vegetal

Microbicida	Alongamento à ruptura (%)	
	Couro wet-blue	Couro atinado
Controle	70,74±5,04	55,50±1,42
TCMTB	84,51±5,66	36,65±0,19
Isotiazolina	86,84±0,47	57,19±0,01
OIT + BMC/óleo	75,18±6,02	56,51±1,89
OIT + BMC/água	81,84±4,70	40,17±8,01
OIT	91,84±4,71	59,47±3,24
Amostra não contaminada atinada		60,51±0,94

Os resultados dos ensaios do teste de resistência físico-mecânica mostram que os valores da tensão de ruptura e do alongamento à ruptura foram mais baixos para as amostras controle de couro wet-blue que foram contaminadas com o fungo, comparadas aos couros wet-blue com microbicidas, indicando assim que couros mal conservados e contaminados sofrem modificações nas suas estruturas e nas suas propriedades físico-mecânicas.

Os couros curtidos com cromo apresentaram maior resistência à ruptura e maior alongamento comparado aos couros curtidos com tanino vegetal. Para couros com tanino vegetal as diferenças entre as amostras controle (contaminadas com fungo) e as amostras protegidas com microbicidas foram menos pronunciadas, na amostra que ficou fora da câmara ficou mais clara a diferença na tensão de ruptura e no alongamento.

4.6 Determinação da concentração inibitória mínima

Os resultados da concentração inibitória mínima (MIC) em mg/L dos microbicidas à base de TCMTB, OIT + BMC/água e PCMC são vistos na Tabela 4.8. Constata-se que o microbicida à base de TCMTB possui menor concentração inibitória mínima, ou seja, uma maior capacidade antifúngica em relação aos microbicidas OIT + BMC/água e PCMC, para os quatro fungos contaminantes, pois menos quantidades aplicadas são necessárias para propiciar a ação antifúngica.

Tabela 4.8: Concentração inibitória mínima dos microbicidas à base de TCMTB, OIT + BMC/água e PCMC, contra quatro diferentes fungos

Contaminante	Concentração inibitória mínima (mg/L)		
	TCMTB	OIT + BMC/água	PCMC
<i>Aspergillus niger</i>	5,00	64,00	100,00
<i>Aspergillus flavus</i>	6,25	64,00	100,00
<i>Penicillium herguei</i>	7,50	10,00	100,00
<i>Penicillium crysogenum</i>	3,00	25,00	100,00

4.7 Sorção e “wash-out”

As Tabelas 4.9 a 4.11 mostram as concentrações residuais dos microbicidas TCMTB, OIT + BMC/água e PCMC, respectivamente, no banho durante o teste de sorção em couro wet-blue.

Tabela 4.9: Concentração residual no banho do microbicida TCMTB no teste de sorção

Oferta de TCMTB	Concentração residual no banho (mg/mL)						
	0 min	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min
0,2 %	1,00	0,37	0,17	0,09	0,07	0,11	0,11
0,5 %	2,50	1,72	0,50	0,35	0,22	0,16	0,21

Tabela 4.10: Concentração residual no banho do microbicida OIT + BMC/água no teste de sorção

Oferta de OIT+ BMC /água	Concentração residual no banho (mg/mL)						
	0 min	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min
0,2 %	1,00	0,26	0,22	0,29	0,37	0,31	0,32
0,5 %	2,50	0,50	0,31	0,33	0,36	0,30	0,47

Tabela 4.11: Concentração residual no banho do microbicida PCMC no teste de sorção

Oferta de PCMC	Concentração residual no banho (mg/mL)						
	0 min	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min
0,2 %	1,00	0,78	0,41	0,38	0,43	0,38	0,36
0,5 %	2,50	1,28	0,94	0,98	1,02	0,76	0,60

As Figuras 4.37 a 4.39 mostram a porcentagem sorvida dos microbicidas TCMTB, OIT + BMC/água e PCMC, respectivamente, pelo couro wet-blue.

A máxima capacidade de sorção do TCMTB para o couro wet-blue foi de 94,20 % para a oferta de 0,2 %, após 15 minutos, já para a oferta de 0,5 %, a máxima capacidade de sorção foi de 92,56 % atingida após 30 minutos de banho. Mas, pela observação das curvas pode-se

considerar que esta diferença de 15 para 30 min é decorrente de erro experimental e que as curvas são praticamente coincidentes, logo o tempo para atingir o equilíbrio foi atingido em 15 min de banho.

Para o microbicida a base OIT+BMC/água, a maior sorção foi atingida em apenas 5 minutos de banho para ambas ofertas de fungicida, sendo elas 77,11 % para a oferta de 0,2 % e 89,24 % para a oferta de 0,5 %.

Para o microbicida a base de PCMC uma maior sorção foi observada após 60 minutos de banho para as ofertas de 0,2 % e 0,5 % sendo de 63,74 % e 76,94 % respectivamente.

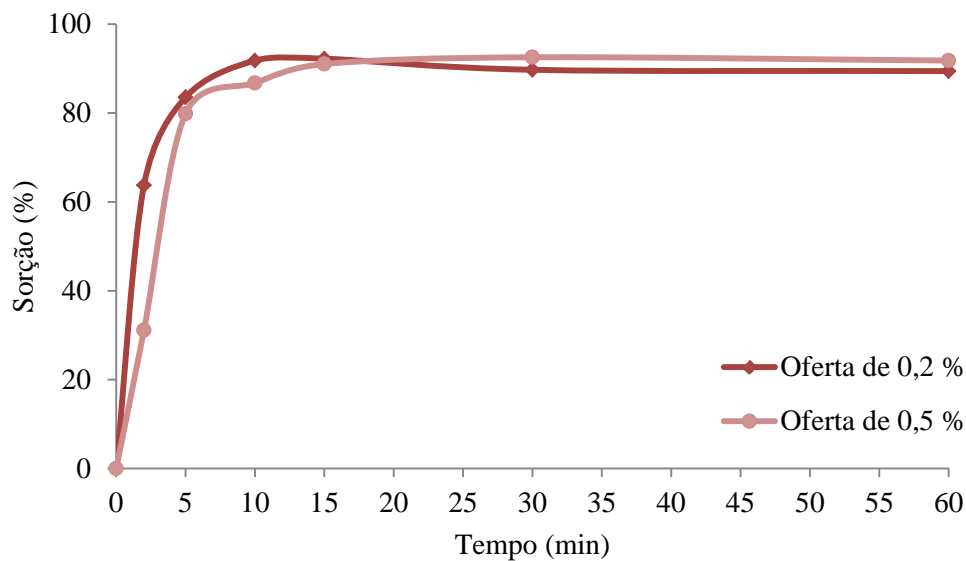


Figura 4.37: Porcentagem do microbicida TCMTB sorvida pelo couro wet-blue

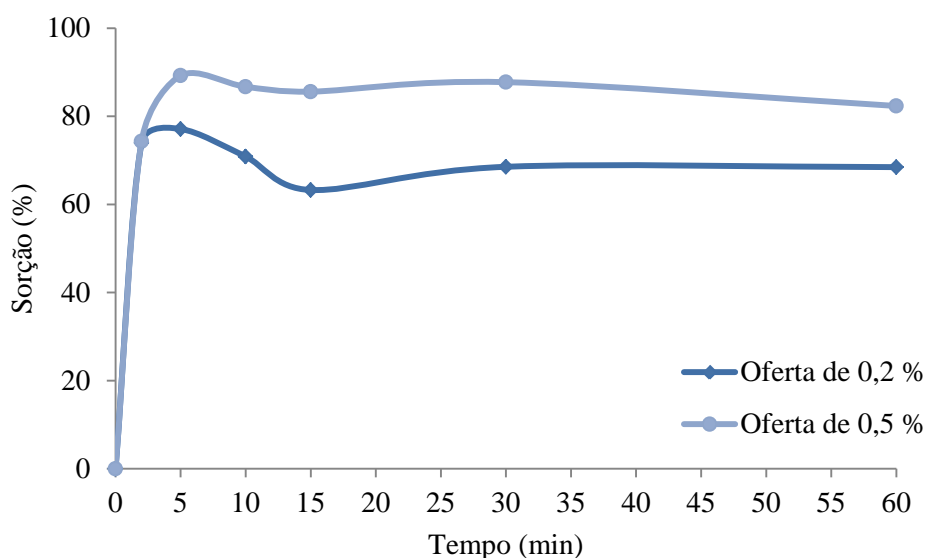


Figura 4.38: Porcentagem do microbicida OIT + BMC/água sorvida pelo couro wet-blue

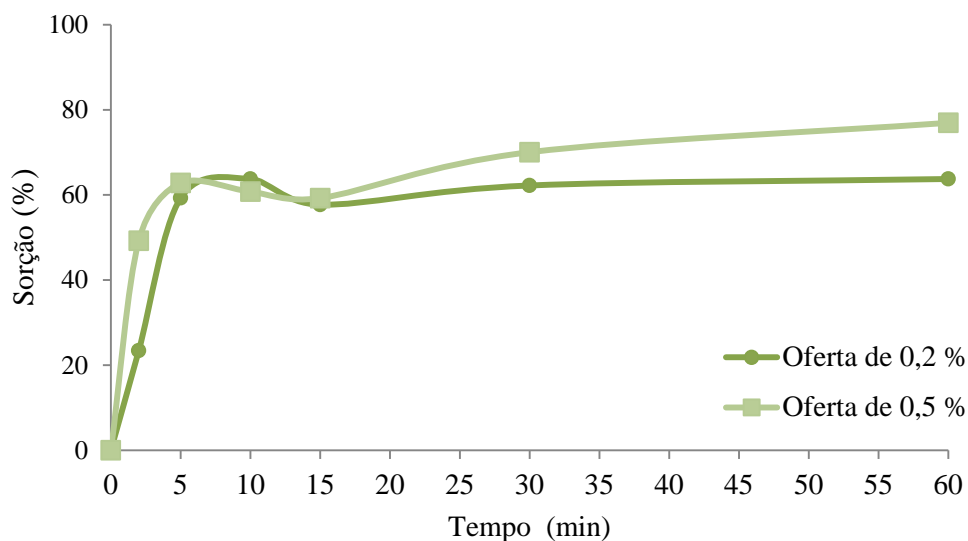


Figura 4.39: Porcentagem do microbicida PCMC sorvida pelo couro wet-blue

Após o teste de sorção os couros foram submetidos ao teste de *wash-out*. A Tabela 4.12 apresenta as concentrações dos microbicidas no couro wet-blue no final do teste da sorção, sendo estas as concentrações iniciais presente nos couros para o teste de *wash-out*.

Tabela 4.12: Concentrações finais dos microbicidas presentes nas amostras tratadas no teste de sorção

Oferta inicial no teste de sorção	Concentração do microbicida no couro wet-blue (mg de microbicida/g de couro)		
	TCMTB	OIT + BMC/água	PCMC
0,2 %	0,89	0,67	0,64
0,5 %	2,29	2,04	1,89

As Tabelas 4.13 a 4.15 mostram a concentração residual dos microbicidas TCMTB, OIT + BMC/água e PCMC, respectivamente, no banho durante o teste de *wash-out*, quando o couro wet-blue é submetido à lavagem.

Tabela 4.13: Concentração residual no banho do microbicida TCMTB durante o teste de *wash-out*

Oferta de TCMTB	Concentração residual no banho após lavagem (mg/mL)						
	0 min	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min
0,2 %	0,00	0,04	0,04	0,05	0,05	0,06	0,05
0,5 %	0,00	0,07	0,08	0,09	0,09	0,07	0,08

Tabela 4.14: Concentração residual no banho do microbicida OIT + BMC/água durante o teste de *wash-out*

Oferta de OIT + BMC/água	Concentração residual no banho após lavagem (mg/mL)						
	0 min	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min
0,2 %	0,00	0,01	0,01	0,03	0,03	0,06	0,08
0,5 %	0,00	0,04	0,12	0,15	0,16	0,17	0,18

Tabela 4.15: Concentração residual no banho do microbicida PCMC durante o teste de *wash-out*

Oferta de PCMC	Concentração residual no banho após lavagem (mg/mL)						
	0 min	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min
0,2 %	0,00	0,01	0,02	0,06	0,10	0,13	0,17
0,5 %	0,00	0,02	0,03	0,06	0,13	0,16	0,17

Nas Figuras 4.40 a 4.42 encontram-se as curvas da cinética de dessorção dos microbicidas à base de TCMTB, OIT + BMC/água e PCMC, respectivamente, pelo couro wet-blue quando o mesmo foi submetido à lavagem.

A porcentagem de microbicida que o couro libera quando submetido à lavagem, é relativamente baixa, permanecendo praticamente constante após 5 minutos de banho, para as diferentes concentrações de TCMTB. A quantidade mais elevada de microbicida dessorvida foi observada após 30 minutos de banho, e foi de 12,68 % para uma oferta de 0,2 % e de 7,52 % para uma oferta de 0,5 %.

Para os couros tratados com OIT+BMC/água e PCMC, as quantidades de microbicida dessorvida mantiveram-se em elevação com o tempo de ensaio, não atingindo o equilíbrio. A porcentagem de microbicida liberadas foi considerada alta, pois após 60 minutos de banho as porcentagens dessorvidas observada para as ofertas de 0,2 % e 0,5 % dos dois diferentes microbicidas foram de 23,11 % e 17,94 % para o microbicida OIT+BMC/água, e de 51,49 % e 18,35 % para o microbicida PCMC. Isto indica que couros processados com a adição dos microbicidas OIT+BMC/água e PCMC não devem ser submetidos a lavagens por tempos longos.

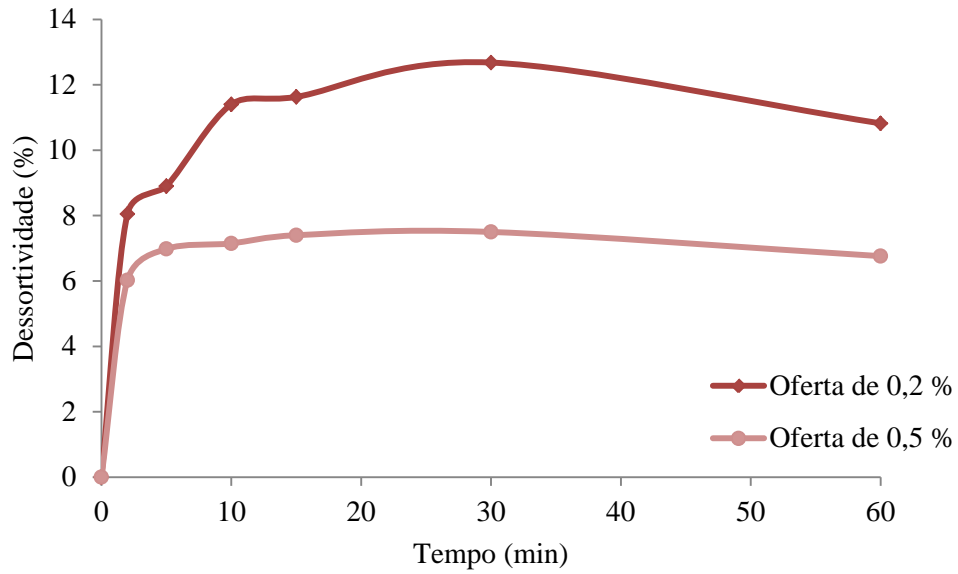


Figura 4.40: Porcentagem dessorvida do microbicida TCMTB pelo couro wet-blue

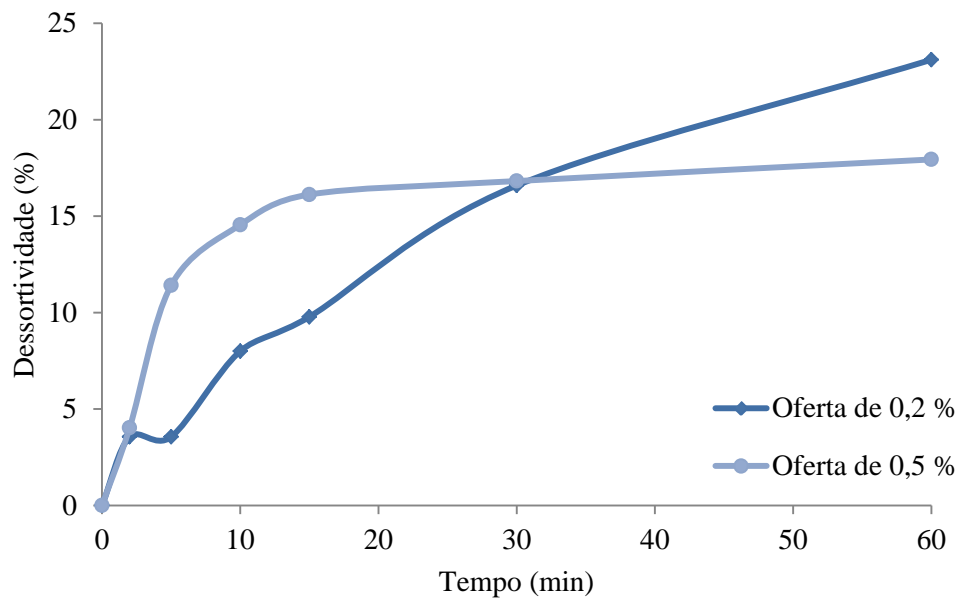


Figura 4.41: Porcentagem dessorvida do microbicida OIT + BMC/água pelo couro wet-blue

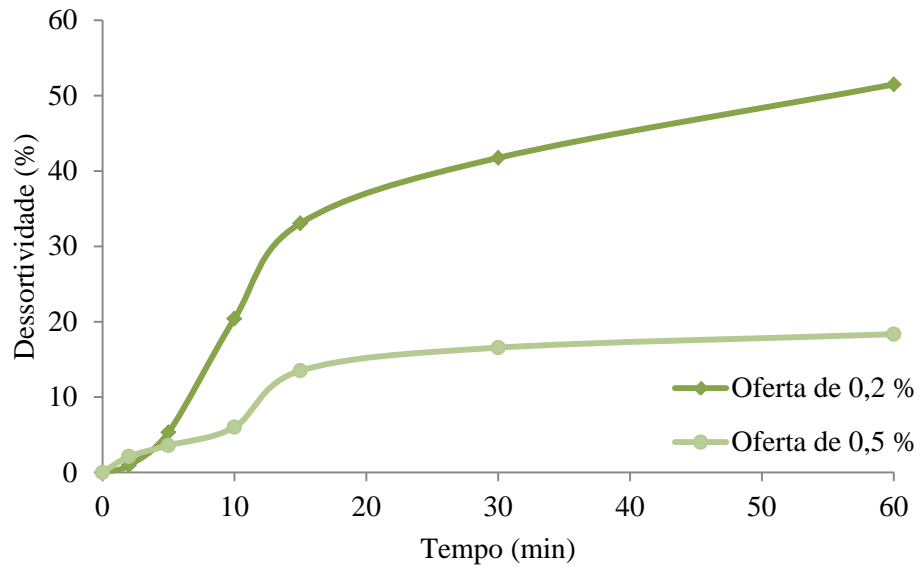


Figura 4.42: Porcentagem dessorvida do microbicida PCMC pelo couro wet-blue

4.8 Manchas e danos causados pelo ataque fúngico

As amostras obtidas através do teste de plaqueamento foram submetidas à lavagem para remoção dos fungos e para a verificação de manchas e danos pela deterioração.

As Figuras 4.43 a 4.47 mostram as manchas e a deterioração de amostras de couros e peles contaminadas com *Aspergillus niger* e *Penicillium herguei*.



Figura 4.43: Manchas de difícil remoção em amostras de couros wet-blue causadas pelo fungo *Aspergillus niger*



Figura 4.44: Manchas de difícil remoção em amostras de couros curtidos com tanino vegetal causadas pelo fungo *Aspergillus niger*



Figura 4.45: Degradação das amostras de peles piqueladas causadas pelo fungo *Aspergillus niger*



Figura 4.46: Manchas de difícil remoção em amostras de couros curtidos com tanino vegetal causadas pelo fungo *Penicillium herguei*

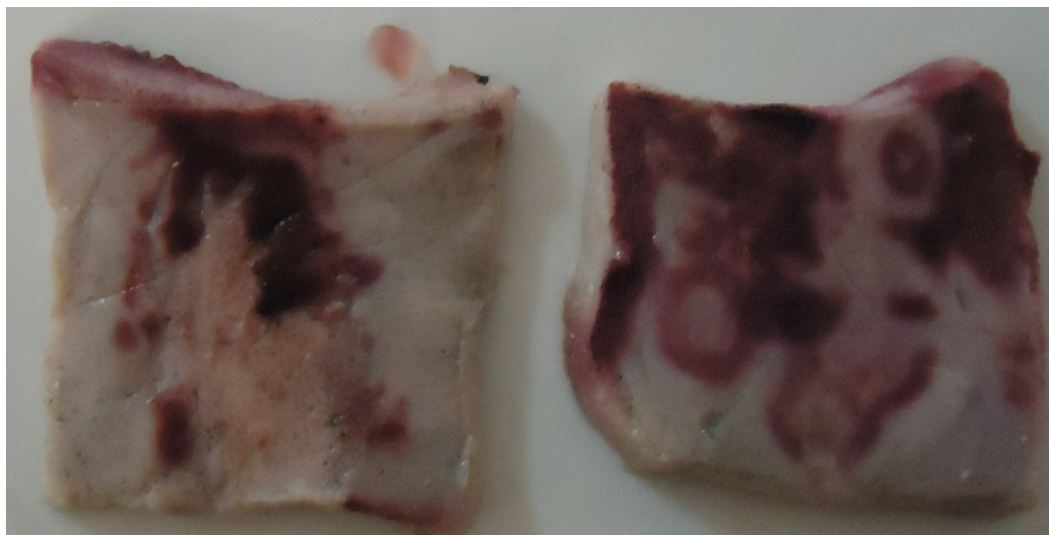


Figura 4.47: Manchas de difícil remoção em amostras de peles piqueladas causadas pelo fungo *Penicillium herguei*

Foram analisadas onze amostras no microscópio eletrônico de varredura, gerando quarenta e cinco imagens de pele piquelada, couro wet-blue e couro atanado, em diferentes graus de magnificação, provenientes do teste de plaqueamento após tratamento prévio.

A apresentação de todas as imagens obtidas seria excessiva, sendo assim algumas imagens representativas de cada amostra foram escolhidas para fins de comparação entre peles e couros não contaminados e contaminados pelos fungos.

As Figuras 4.48 a 4.50 mostram as amostras não contaminadas e contaminadas pelos fungos geradas utilizando uma magnificação de 150 vezes.

As amostras não contaminadas de pele piquelada e de couro wet-blue foram tratadas com o microbicida TCMTB (0,2 %) e contaminada com *Aspergillus niger*. Já a amostra de couro curtido com extrato vegetal foram curtidas com o microbicida OIT+BMC/água e contaminadas com *Aspergillus niger*.

Todas as amostras contaminadas provêm do teste de plaqueamento as quais foram empregadas como controle (sem a adição de microbicida).

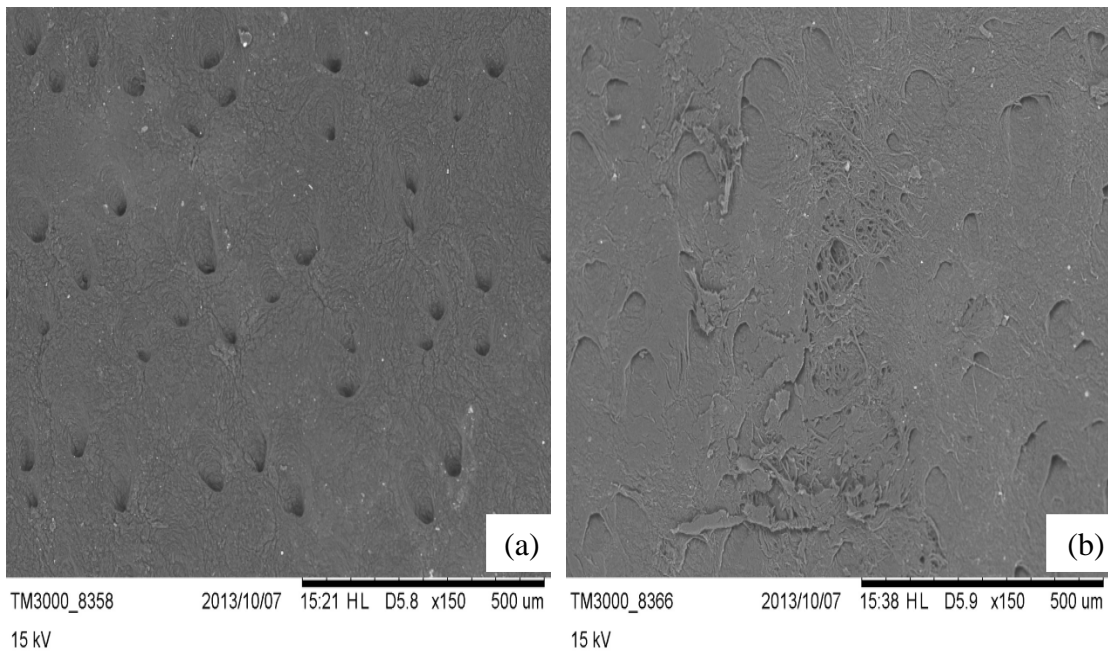


Figura 4.48: Imagens das amostras de peles piqueladas (a) não contaminada e (b) contaminada com *Aspergillus niger*

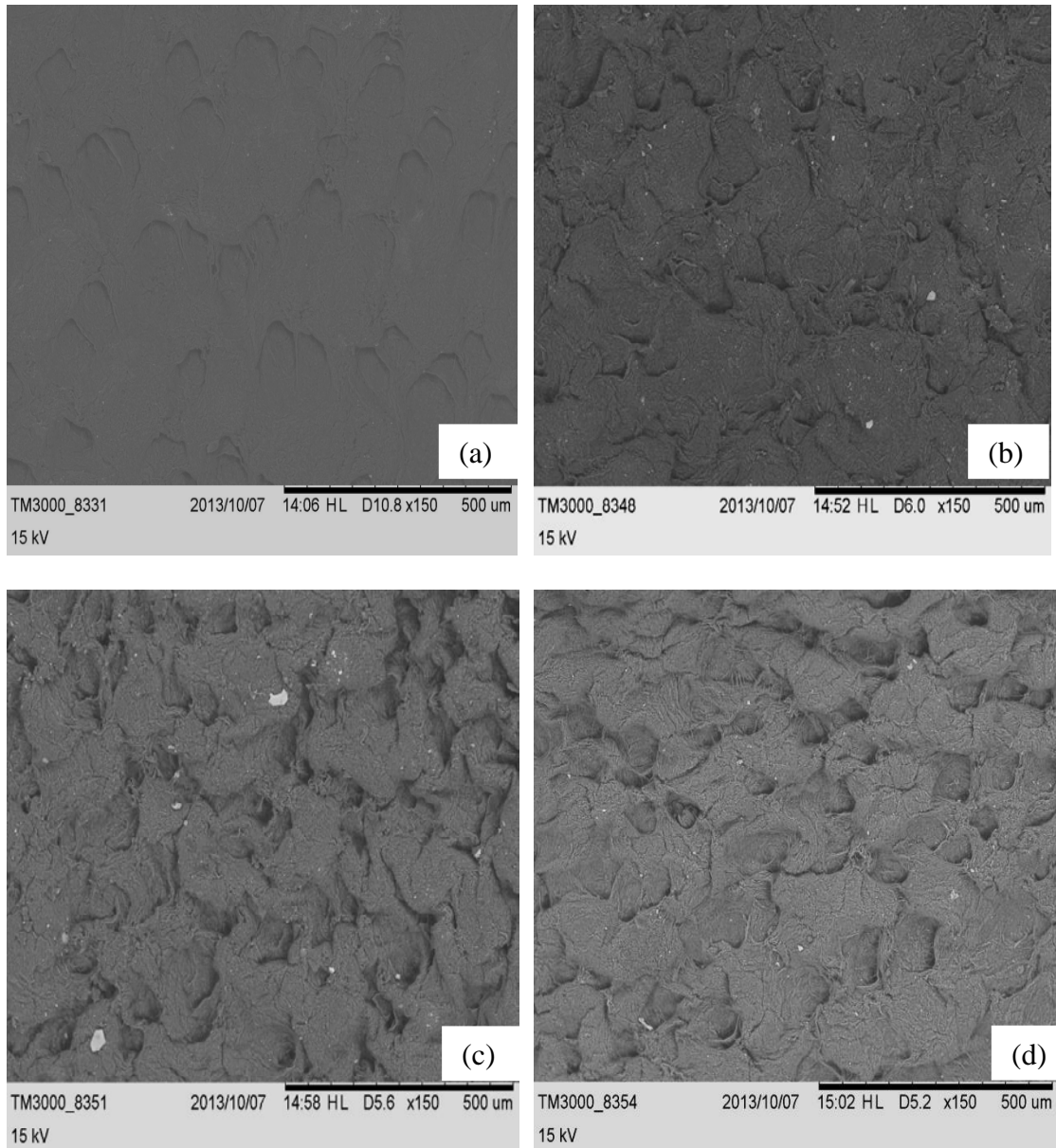


Figura 4.49: Imagens das amostras de couros wet-blue (a) não contaminada, (b) contaminada com *Aspergillus niger*, (c) contaminada com *Aspergillus flavus* e (d) contaminada com *Penicillium herguiei*

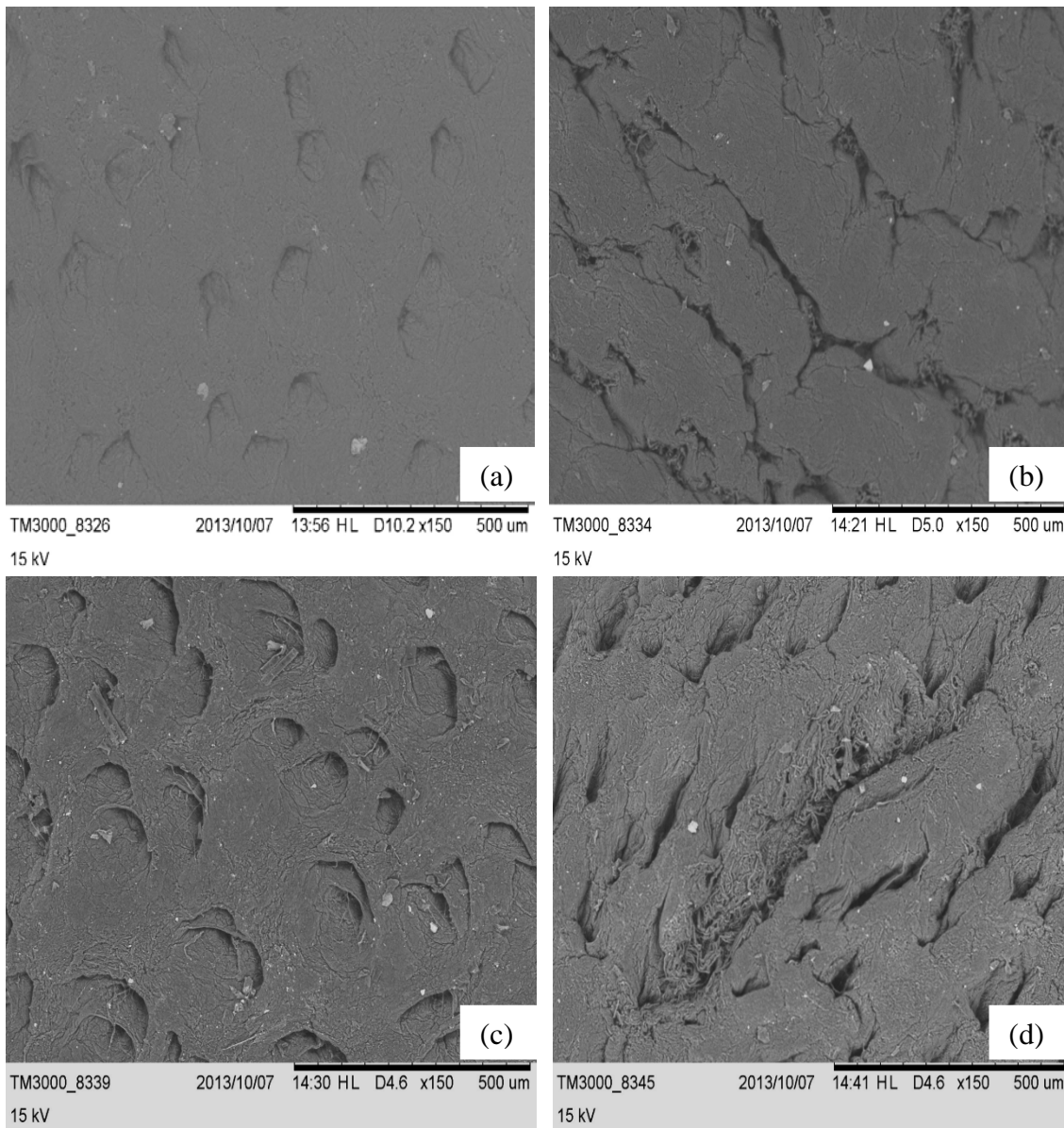


Figura 4.50: Imagens das amostras de couros curtidos com tanino vegetal (a) não contaminada, (b) contaminada com *Aspergillus niger*, (c) contaminada com *Aspergillus flavus* e (d) contaminada com *Penicillium herguei*

De acordo com as imagens, verifica-se que as amostras não contaminadas possuem as superfícies lisas, intactas, com os poros bem definidos. Enquanto que nas amostras contaminadas as superfícies estão danificadas, os microrganismos ao se utilizarem do material (pele, couro), atacado para suas necessidades nutricionais, consumiram parte dele expondo as fibras, danificando-as e causando rugosidade na superfície.

Capítulo 5

Conclusões e sugestões para trabalhos futuros

A partir da avaliação dos resultados obtidos e discutidos neste trabalho, pode-se observar que em algumas aplicações de microbicidas em peles e couros não houve proteção antimicrobiana, indicando que há a necessidade de emprego de ofertas maiores de microbicida ou devem ser pesquisadas novas alternativas de microbicidas (tanto já existentes no comércio para couro, de outros setores de aplicação ou ainda em fase de desenvolvimento científico e tecnológico). Assim conclui-se que:

- Teste de **plaqueamento**:

Peles remolhadas: somente o TCMTB mostrou-se eficiente contra o ataque das bactérias *Bacillus subtilis* e *Streptomyces* sp., para oferta recomendada pela indústria química de 0,2 %.

Peles piqueladas: o fungo *Aspergillus flavus* mostrou resistência à ação dos cinco microbicidas (TCMTB, Isotiazolina, OIT+BMC/óleo, OIT+BMC/água e OIT) também na oferta recomendada de 0,2 %.

Couros wet-blue: os microbicidas TCMTB e OIT+BMC/água, quando aplicados na oferta de 0,2 %, revelaram elevada capacidade antifúngica contras todos os fungos testados (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium herguei* e *Penicillium chrysogenum*).

Couros curtido com tanino vegetal: os cinco microbicidas, quando aplicados na oferta indicada de 0,2 %, mostraram ter uma baixa capacidade antifúngica contra os

fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*. Quando os testes foram realizados para as ofertas de 0,50 e 0,75 % dos microbicidas TCMTB e OIT+BMC/água, 0,75 % do microbicida TCMTB não foi suficiente para inibir o crescimento, já a oferta de 0,75 % do microbicida OIT+BMC/água inibiu o crescimento dos quatro fungos contaminantes.

- Utilizando a mesma oferta de microbicida para o processamento de couros wet-blue e curtidos com tanino vegetal, os couros curtidos ao cromo mostraram-se mais resistente ao ataque fúngico, isso pode ser atribuído à presença de nutrientes como açúcares simples que estão presentes nos extratos vegetais, além dos óleos que são adicionados no processo de engraxe, que servem de alimentos para os fungos.

- Os resultados obtidos no teste da **câmara tropical**, utilizando *Aspergillus niger* como contaminante, mostraram uma compatibilidade com o teste de plaqueamento.

- No processo de **biodeterioração em solo** observou-se uma diminuição da massa das amostras devido ao ataque de microrganismos, mostrando a validade deste teste preliminar e que há uma modificação das estruturas dos couros com perda de material protéico.

- Os resultados do **ensaio de tração** mostram que couros sem preservação ou mal preservados (oferta de microbicida insuficiente para evitar a contaminação fúngica), sofreram sim prejuízo nas suas propriedades físico-mecânicas.

- No ensaio da **concentração inibitória mínima** (MIC), uma menor concentração do microbicida TCMTB inibiu o crescimento dos quatro fungos testado.

- No teste de **sorção e wash-out** com os microbicidas TCMTB, PCMC e OIT+BMC/água, o microbicida à base de TCMTB foi sorvido rapidamente pelo wet-blue e apenas uma pequena porcentagem restou no banho residual. A porcentagem deste microbicida dessorvida pelo couro submetido à lavagem, foi relativamente baixa, indicando assim que o microbicida possui uma resistência à lavagem, o que não é observado para os couros tratados com os microbicidas PCMC e OIT+BMC/água.

Considerações finais:

- O uso apropriado do microbicida é o primeiro requisito para a proteção de peles e couros, sendo de fundamental importância para a indústria coureira.
- Dos microbicidas estudados, o microbicida a base de TCMTB, mostrou melhor eficiência quando aplicado nas etapas de remolho contra o ataque de bactérias *Bacillus subtilis*, e *Streptomyces*. sp., nas etapas de píquél e curtimento ao cromo contra o ataque dos fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium herguei* e *Penicillium chrysogenum*.
- Para os couros curtidos com tanino vegetal o microbicida OIT+BMC/água é o mais indicado para a preservação contra o ataque dos fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium herguei* e *Penicillium chrysogenum*.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho fazem-se algumas sugestões para a realização de trabalhos futuros:

- Realizar ensaio de toxicidade dos microbicidas estudados;
- Utilizar novos microbicidas para verificar a eficiência destes contra o ataque microbiano quando aplicados em peles e couros;
- Realizar novos testes aplicando diferentes ofertas dos microbicidas;
- Realizar o teste da câmara tropical utilizando outros fungos como contaminantes;
- Aprofundar os estudos relativos ao uso de microbicidas naturais obtidos através de metabólitos secundários de fungos;
- Testar associações de microbicidas naturais e microbicidas sintéticos aplicados ao couro no controle de microrganismos.

Referências bibliográficas

ABQTIC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE QUÍMICOS E TÉCNICOS DA INDÚSTRIA DO COURO. Guia Brasileiro do Couro, 2012.

ABDEL-MAKSOU, G. Evaluation of wax or oil/fungicide formulations for preservation of vegetable-tanned leather artifacts. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, v. 90 p.58, 2006.

ABNT NBR Couros — Determinação da resistência à tração e alongamento. 11041:2012: 9p 2012.

ADMINIS, U.; HUYNH, C.; MONEY, C.A. The need for improved fungicides for wet-blue. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, v. 86, p. 118-121, 2002.

ADZET, J.M. Collagen Materialis. *Journal of the American Leather Chemists Association*, v. 105, p. 254-259, 2010.

ANASTASSIADES, M.; SCWACK, W. Analysis of carbendazim, benomyl, thiophante methyl and 2, 4-diclorophenoxyacetic acid in fruits and vegetables after supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, v. 825, p. 45-54, 1998.

ASTM. Standard Test Method for Mold Growth Resistance of Wet Blue. D4576 – 08: 3p 2008.

ASTM. Standard Test Method for Evaluating the Resistance of the Surface of Wet Blue to the Growth of Fungi in an Environmental Chamber D7584 – 10: 3p 2010.

ASTM. Standard Test Method for Chromic Oxide in Leather (Perchloric Acid Oxidation) D 2807 – 93 (Reapproved 1998): 3p 1993.

ATC. Preservação de peles e couro. *Revista do couro*, v. 189, p. 88 -91, 2007.

BAYRAMOĞLU, E.E.E. Antibacterial activity of *myrtus communis* essential oil used in soaking. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, v. 90, p.217-219, 2006.

BAYRAMOĞLU, E.E.; GULUMSER, G.; KARABOZ, I. Ecological and innovative fungicide for the leather industry: Essential oil of *origanum minutiflorum*. *Journal of the American Leather Chemists Association*. v.101, p. 96, 2006.

BORDIGNON, S. R.; COOPER, M.; GUTTERRES, M.; SCHOR, A. V.; BRESOLIN, L.; FUCHS, W.F.; KNORR, S. R. Novel Natural Dyes for Eco-Friendly Leather Articles. AQEIC. Asociación Química Española de la Industria del Cuero, v. 63, p. 93-99, 2012.

BOTT, T. R. The use of biocides in industry. In: *Biofilms- Science and Technology. Applied sciences*, v. 223, p. 567-581, 1992.

BRAKHAGE, A.A.; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites – Strategies to activate silent gene clusters, *Fungal Genetics and Biology*, 2010.

BRYANT, S. D.; HURLOW, E. L.; WHITTEMORE, M. S. A New Antifungal Agent for the Leather Industry: S-Hexyl-S'-Chloromethylcyanodithiocarbamate (CHED). *Journal of the Society of Leather Technologists*, v. 95, p.07–10, 2011.

BURK, J.M. Slime control seminar. Buckman Laboratories International Inc, Campinas-SP, Brasil, 1984.

BURROWS, L.A.; EDWARDS, C.A.; The use of integrated soil microcosms to assess the impact of carbendazim on soil ecosystems. *Ecotoxicology*, v. 13, p. 143-161, 2004.

CAN, A. E ALBERTINI, D. F. M-phase specific centrosome-microtubule alterations induced by the fungicide MBC in human granulosa cells. *Mutation Research*, v. 373 p. 139–15, 1997.

CÍTERA, G.; MARGOSIAN, G. A conservação do couro. *Revista do couro*, v. 181, p. 68 -70, 2006.

CHANGQING, Z.; HAIBIN, G.; WUYONG, C. Isothiazolinone as a fungicide for leather and shoe lining. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, v. 90, p.246, 2006.

CUADROS, S.; MANRESA, M.A.; FONT, J.; BAUTISTA, M.E.; PUIG, R.; MARSAL, A. Alternative Fungicides for the Leather Industry: Application in Various Processes. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, v. 96, p.225-233, 2012.

CUADROS, S.; MANRESA, M.A.; FONT, J.; BAUTISTA, M.E.; MALDONADO, F.; MARSAL, A. Alternative Fungicides: Comparisons with Conventional Chemicals. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, v. 95, p.263-269, 2011.

DALTON, D. L. New generation fungicide for the leather industry. *Journal of the American Leather Chemists Association*, v. 107, p. 21-30, 2012.

DASU, V.V.; PANDA, T.; CHIDAMBARAM, M. Determination of significant parameters for improved griseofulvin production in a batch bioreactor by Taguchi's method. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 877-880, 2003.

DENNING, D. W. Echinocandin antifungal drugs. *The lancet*, v. 362, p. 1142-1151, 2003.

DENNING, D.W.; HOPE, W.W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities, *Trends in Microbiology*, v. 18, p. 195-204, 2010.

DENYER, S.P.; STEWART, G.S.A.B. Mechanisms of action of disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 41, p. 261-268, 1998.

DETTMER, A.; CAVALLI, É ; GUTTERRES, M. ; AYUB, M. A. Z. . Optimization of the unhairing leather processing with enzymes and the evaluation of inter-fibrillary proteins removal: an environment-friendly alternative. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 35, p. 1317, 2012.

DIEDOVIEC, E. Estudo de um novo agente preservante em peles e couros. Trabalho de conclusão de curso – UFRGS, 2009.

FARAG, A.; EBRAHIM, H.; ELMAZOU DY, R.; KADOUS, E. Developmental Toxicity of Fungicide Carbendazimin Female Mice. *Birth Defects Research*, v. 92, p.122–130, 2011.

FLORES, A.; GONÇALVES, E.; RAUBER, M.P.M. Materiais para calçados: couro e outros materiais de corte. Novo Hamburgo: Centro Tecnológico do couro, calçados e Afins, 2002.

FONT, J.; REYES, M.; CUADROS, S.; BACARDIT, A.; MARSAL, A. Determination of TCMTB and other fungicidas in leather. *Journal of the American Leather Chemists Association*, v. 106, p. 341-348, 2011.

FUCK, W. F.; GUTTERRES, M.; ODY, D.; GRASSELLI, L. P.; LOPES, F. C.; BRANDELLI, A. Development of fungal dyes and application in leather dyeing. In: XXXII Congress of the International Union of Leather Technologists and Chemists Societies, Turquia, 2013.

GATIUS, R.; KOLLING, C.; SÁNCHEZ-RUIZ X. Uso e controle de Biocidas. *Revista do Couro*, v.190, p. 94-97, 2007.

GONZÁLEZ, D.M.; & GRACIA, L.G.; CAMPAÑA, A. M. G.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Use of dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of carbamates in juice samples by sweeping-micellar electrokinetic chromatography. *Anal Bioanal Chem*, v. 400, p. 1329–1338, 2011.

GODÍNEZ, F.Q. Importancia del uso de un bactericida apropiado en el remojo de las pieles. In: XXVII Congress of the International Union of Leather Technologists and Chemists Societies, México, 2003.

GRIEBEL, R. Microbicidas para a Indústria de Couros. *Revista do Couro*, v. 123, p 46-49, 1997.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of Natural Products*, v. 69, p. 509-526, 2006.

GUTHEIL, N. C. Manual do curtidor. Porto Alegre: Fundação de ciência e Tecnologia, 1975.

GUTTERRES, M. Estrutura de colagênio da pele. *Revista do couro*, v. 170, p.5, 2004.

GUTTERRES, M. Ciência rumo à tecnologia do couro, Porto Alegre, Tríplice Assessoria e Soluções Ambientais Ltda., 2008.

GUTTERRES, M. Apostila da Disciplina Tecnologia do Couro I, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2013.

HAIBIN, G.; ZHIYUAN, W.; YANGXIN, L.; WUYONG, CHEN. Potential fungicidal use of essential oils extracted from traditional chinese medicinal materials. *Journal of the Society of Leather Technologists*, v. 95, p.192–199, 2011.

HAUBER, C. “Fungicides”, www.leathermag.com. Published 16 august , 2008.

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

HOINACKI, E.; MOREIRA, M.V.; KIEFER, C.G. Manual Básico de Processamento do Couro. Porto Alegre: SENAI, 1994.

KANAGARAJ, J.; BABU, C.N.K.; SADULLA, S.; RAJKUMAR, S.G.; VISALAKSHI, V.; KUMA, C.N. Cleaner techniques for the preservation of raw goat skins. *Journal of Cleaner Production* , v. 9, p. 261-268, 2001.

KANAGARAJ, J.; SUNDAR, V. J.; MURALIDHARAN, C.; SADULLA, S. Alternatives to sodium chloride in prevention of skin protein degradation - a case study. *Journal of Cleaner Production*, v. 13, p.825 -831, 2005.

KATHIRAVAN, M.K.; SALAKE, A.B.; CHOTHE, A.S.; DUDHE, P.B.; WATODE, R.P.; MUKTA M.S.; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 20, p. 5678–5698, 2012.

KELLER, N.P.; TURNER, G.; BENNETT, J. Fungal secondary metabolism-from biochemistry to genomics, *Nature Reviews Microbiology*, v.3, p. 937-947, 2005.

LINDNER, W. & NEUBER, H.U. Preservation in the Tannery. *International Biodeterioration*, v. 26, p. 195-203, 1990.

LINHARES, S.; GEWANDSZNAJDER, F. *Biologia Hoje : Seres Vivos..* Ed. São Paulo: Atica, v. 2, 1992.

LOPES, S. *BIO: Livro Amarelo*. 4ª. Edição. São Paulo: Ed.Saraiva, 1988.

MARAFON, E.A.M. Depilação enzimática-oxidativa de peles para curtimento, Dissertação de mestrado - UFRGS, 2012.

MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi – Progress, obstacles and future trends, *Biotechnology Advances*, v. 26, p. 177-85, 2008.

MUELLER, G.M.; SCHMIT, J.P. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodiversity and Conservation*, v. 16, p. 1–5, 2007.

MURALIDHARAN, D.; SUNDARA RAO, V.S. Identification of leather preservatives by gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, v. 675, p.257-260, 1994.

MUTHUSUBRAMANIAN, L.; MITRA, R. B. A cleaner production method for the synthesis of bronopol - A bactericide that is useful in leather making. *Journal of Cleaner Production*, v.14, p. 536-538, 2006.

MUTHUSUBRAMANIAN, L.; SUNDARA RAO, V. S., MITRA, R. B. Convenient synthesis of methylene bithiocyanate as microbiocide. *Journal of Cleaner Production* v. 11, p. 695–697, 2003.

ODABASI, Z.; PAETZNICK, V. L.; RODRIGUEZ, J. R.; CHEN, E.; OSTROSKYZEICHNER, L. *In vitro* activity of anidulafungin against selected clinically important mold isolates. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, v. 48, p. 1912-1915, 2004.

ORLITA, A. Microbial biodeterioration of leather and its control: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.53, p.157–163, 2004.

PAULUS, W. Directory of microbicides for the protection of materials. Boston, Kluwer academic publishers dordrecht, 2005.

PEARCE, C. Biologically active fungal metabolites. *Advances in Applied Microbiology*, v. 44, p. 1-68, 1997.

PELCZAR, J.M.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N. R. Microbiologia: conceitos e aplicação. São Paulo, MACRON Books, 1996.

PENNA, T. C. V. Desinfecção e Esterilização Química. Editora Atheneu. 2ª Edição, 2005.

PHAFF, H. J. Industrial microorganisms. *Scientific American*, v. 245, p. 77-89, 1981.

RUIZ, X. S.; IZQUIERDO, A.; KOLLING, C. Desenvolvimento de novos fungicidas a base de TCMTB. *Revista do Couro*, v.184, p. 76-78, 2006.

REGGI, R. Importância da verificação da eficiência de biocidas: couro e poliuretano. *Revista do couro*, v. 116, p. 55 -56, 1996.

REYES, L.H.; WRÓBEL, K.; WRÓBEL, K. Indirect extraction-spectrophotometric determination of 2-(thiocyanomethylthiol) benzothiazole in chrome tanning liquors after its breakdown to 2-mercaptobenzothiazole. *Talanta*, v. 56, p. 515–521, 2002.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. *Mycological Research*, v. 109, p. 661-686, 2005.

SIRVAITYTE, J.; SIUGZDAITE, J.; VALEIKA, V.; DAMBRAUSKIENE, E. Application essential oils of thyme as natural preservative in leather tanning. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, v. 61, p. 220, 2012.

SOUSA, P. J.; RODRIGUES, J. M. L.; LOUREIRO, S.; SOARES, A. M. V. M.; JONES, S. E. Ring-testing and field-validation of a terrestrial model ecosystem (TME) – an instrument for testing potentially harmful substances: Effects of carbendazim on soil microbial parameters. *Ecotoxicology*, 13(1): 43–60, 2004.

SOUZA, F. R.; GUTTERRES, M. Application of enzymes in leather processing: a comparison between chemical and coenzymatic processes. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 29, p. 473-482, 2012.

STROHL, W. R. The role of natural products in a modern drug Discovery program. *Drug Discovery Today*, v. 5, p. 39-41, 2000.

STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, v.67, p. 257-268, 2004.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica, *Química Nova*, v. 31 (7), p. 1807-1813, 2008.

TORTORA, G. R. *Microbiologia*. 8ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TUOMELA, M. ; VIKMAN,M.; HATAKKA, A.; ITÄVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*, v. 72, p. 169-183, 2000.

VIKTOROV, A. V.; YURKIV, V. A. Effects of Carbendazim on Kupffer Cell Functioning. *Biophysics and biochemistry*, v.154, p.438-440, 2013.

VERMELHO, A.B.; PEREIRA, A.F.; COELHO, R.R.R.; PADRÓN, T.S. Práticas de Microbiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

VIDOTTO, A.; RODRIGUES, L.; DONATI, T.; CEGATTI, A.R. O uso de extratos naturais como fungicida em couros. *Revista do couro*, v. 192, p. 68-74, 2007.

ZUGNO, L. A. Quebrando paradigmas: um novo fungicida para couros. *Revista do couro*, v. 219, p. 42-44, 2011

ZUGNO, L. A.; HURLLOW, E.; OPPONG, D. Crescimento de fungos em couro wet blue: Métodos para medir o impacto na qualidade do couro. *Revista do couro*, v. 208, p. 35-42, 2010.

Anexo A

Testes de fungicidas a partir de metabólitos secundários

Revisão bibliográfica

Metabólitos secundários

Os metabólitos secundários produzidos pelos fungos são compostos de baixo peso molecular que possuem uma variedade de estruturas químicas complexas, as quais são produzidas pelos microrganismos logo que a fase de crescimento esteja completa (PHAFF, 1981).

A produção de metabólitos secundários bioativos por fungos é um processo complexo. Estas substâncias isoladas de fungos pertencem a diversas classes químicas como esteróides, alcalóides, compostos fenólicos, compostos alifáticos, xantonas, peptídeos, quinonas, terpenóides, citocalasinas e diversos outros grupos estruturais (SCHULZ e BOYLE, 2005).

Muitos compostos, com ação fungicida, têm sido isolados de fungos. Um exemplo de isolados fúngicos com ação fungicida, são as equinocandinas que constituem uma nova classe de agentes antifúngicos. São derivados hexapeptídeos cíclicos ligados a um ácido graxo de cadeia longa e agem através da inibição da beta (1, 3)-D-glucanasintase, uma enzima necessária para a integridade da parede celular (DENNING, 2003). Este grupo, no qual se incluem caspofungina, anidulafungina, micafungina (Figura A.1), têm demonstrado atividade fungicida frente a maioria das espécies de *Candida* e *Aspergillus*, porém possuem baixa atividade contra outras espécies de fungos (DENNING e HOPE, 2010; ODABASI *et al.*, 2004).

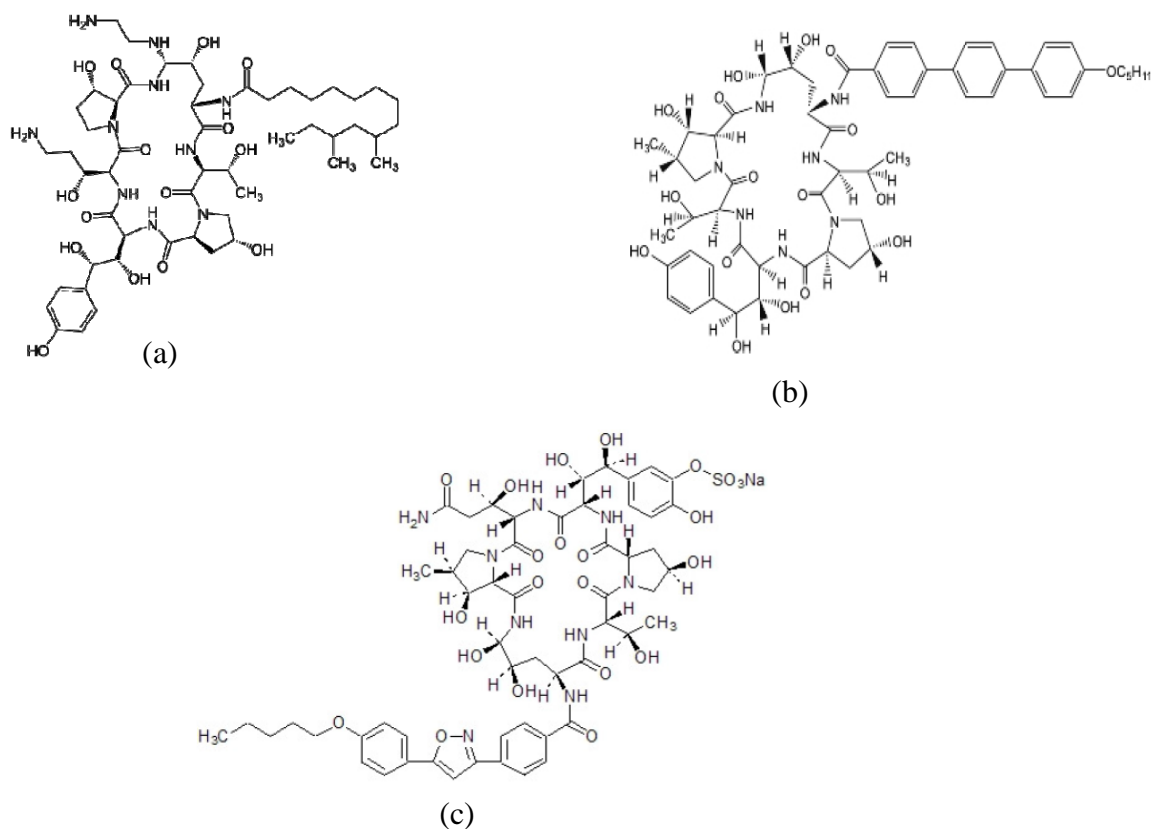


Figura A.1: Estruturas moleculares da (a) Caspofungina, (b) Anidulafungina, (c) Micafungina

Outro metabólito antifúngico com excelente atividade, é a griseofulvina, Figura A.2, isolada de culturas de *Penicillium griseofulvum* (DASU *et al.*, 2003), que atua ao interagir com os microtubulos e ao interferir na mitose.

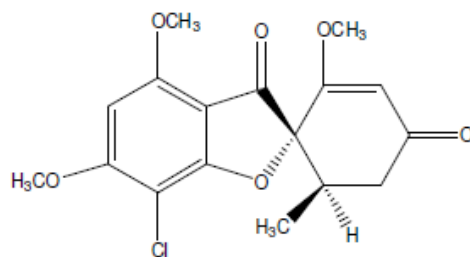


Figura A.2: Estrutura molecular da Griseofulvina

BAYRAMOGLÜ (2006) verificou a ação bactericida de um produto completamente natural, o óleo essencial de *Myrtus communis* (Murta comum), em comparação com um microbicida comercial, o PCMC. Ambos bactericidas foram adicionados no processo de remolho de peles. Após 7 horas de ensaio, os bactericidas, natural e comercial, mostraram

resultados semelhantes, o número total de colônias de bactérias foi determinada sendo de $3,30.10^5$ ufc/ml no final do processo de 7 horas no banho de remolho, com a adição de 1 % de óleo de Murta baseado no peso da amostra e $2,05.10^5$ ufc/ml no banho de remolho, onde 1 % de bactericida comercial foi utilizado, enquanto no banho de remolho utilizado como controle havia 54.10^5 ufc/ml.

HAIBIN *et al.* (2011) investigaram a possibilidade de utilizar como fungicidas para couro wet-blue, quatro óleos essenciais extraídos de substratos utilizados como medicamentos tradicionais chineses contra os fungos *Penicillium citrinum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus stolonifer*. Os óleos essenciais testados incluíam canela, óleo de alho, óleo de cravo e óleo de anis estrelado. Foi utilizado como controle para comparação o microbicida sintético TCMTB. Os resultados mostram que estes óleos essenciais possuem atividade antifúngica e quando há o aumento da concentração utilizada, melhor é o efeito. Com óleo de alho, óleo de canela e óleo de cravo da Índia, a oferta de 2 % é suficiente para inibir o crescimento dos quatro fungos utilizados no estudo, porém para o óleo de anis estrelado, uma dosagem de 2%, não é suficiente, necessitando uma oferta superior, para um resultado semelhante. Em geral, o fungo *Rhizopus stolonifer* foi a estirpe mais resistente e mais difícil de inibir pelos quatro óleos essenciais.

BAYRAMOGLU *et al.* (2006) avaliaram a aplicabilidade do óleo essencial de *Origanum minutiflorum* (Orégano) como fungicida no couro durante os processos de piqué e curtimento contra as espécies de fungos *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Penicillium rubrum* e *Trichoderma viride*. Neste estudo, foram utilizados como controle para comparação dois microbicidas comerciais o TCMTB e o OIT. Os resultados mostram que o óleo essencial de orégano possui uma excelente atividade antifúngica que aumenta com o aumento da concentração. Os testes experimentais ainda revelaram que o couro tratado com óleo essencial de orégano é mais resistente ao ataque fúngico dos quatro fungos usados como contaminantes do que o couro tratado com fungicidas comerciais.

SIRVAITYTE *et al.* (2012) estudaram a utilização de óleos essenciais de *Thymus vulgaris* (Tomilho) como um conservante natural para couro wet-blue. Neste estudo, as bactérias Gram-positivas mostraram-se mais sensíveis aos óleos essenciais do que as bactérias Gram-negativas. A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativa) teve uma baixa sensibilidade à ação dos óleos essenciais selecionados de tomilho, mas as amostras tratadas com estes óleos permaneceram resistentes à ação dessas bactérias. Amostras preservadas com TCMTB tiveram uma proteção inferior quando comparadas com as amostras tratadas com o óleo essencial de tomilho (oferta superior a 3% baseado na massa da amostra). Os resultados

mostraram que o óleo essencial de tomilho poderia ser usado como um agente de preservação na indústria de curtimento de couro.

Metodologia experimental

Foram inoculados em meio líquido Caldo de Batata dextrose (CBD) da marca Himédia dissolvido em água destilada. A solução foi preparada em 24 g CBD/l água e esterilizada em autoclave durante 15 min a 121°C, foram colocados 5 ml da solução contendo as suspensões de 10^5 esporos/ml dos fungos filamentosos *Monascus purpureus*, *Aspergillus niger*, *Diplódia* e *Fusarium graminearum* em Erlenmeyers de 500 ml contendo 250 ml de meio. A cultura foi mantida no Shaker em uma temperatura de 32°C, onde a suspensão permaneceu sob agitação durante períodos de 10, 15, 25, 30 e 45 dias. Cada fungo foi inoculado em 5 Erlenmeyer diferentes. Após o período de incubação as soluções foram centrifugadas, filtradas e concentradas em rotaevaporador.

Os metabólitos secundários filtrados foram aplicados na etapa de curtimento com cromo de acordo com a Tabela 3.4 (pg. 50) em substituição aos microbicidas. Após o curtimento foi realizado o teste de plaqueamento de acordo com o item 3.4.2, para avaliar a provável ação fungicida dos filtrados contras os fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*.

Resultados e Discussões

A Figura A.3 apresenta as soluções filtradas de metabólitos secundários produzidas pelos fungos *Aspergillus niger*, *Monascus purpureus*, *Diplódia* e *Fusarium graminearium*.

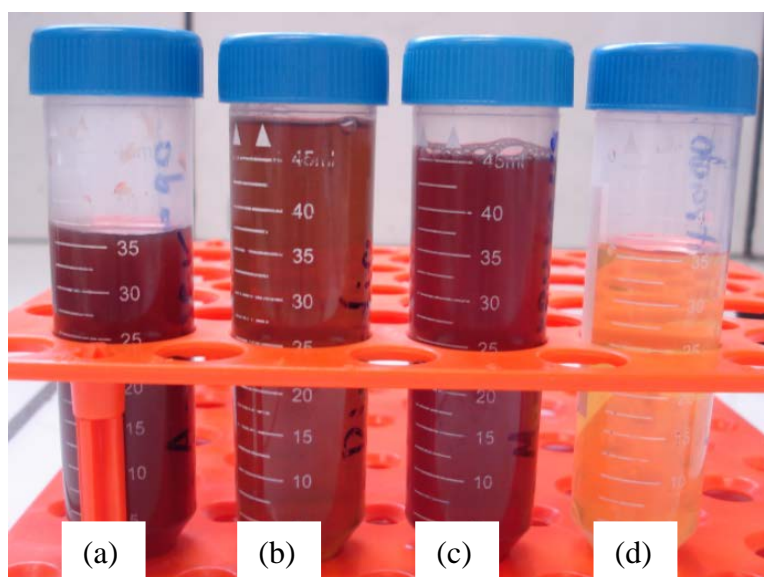


Figura A.3: Soluções filtradas de metabólitos secundários dos fungos (a) *Aspergillus niger*, (b) *Diplódia*, (c) *Monascus purpureus*, e (d) *Fusarium graminearium*

A Figura A.4 mostra os couros curtidos com sais de cromo e com a adição dos metabólitos filtrados substituindo a adição dos microbicidas sintéticos. Foi curtida uma amostra sem a adição de metabólitos utilizada como controle.



Figura A.4: Couros curtidos com adição de metabólitos secundários (a) *Aspergillus niger*, (b) *Diplódia*, (c) *Monascus purpureus*, e (d) *Fusarium graminearum* e (e) controle

As Figuras A.5 e A.6 apresentam o teste de plaqueamento realizado com as amostras de couros curtidas com os diferentes filtrados contra o ataque dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* respectivamente, após 28 dias de teste.

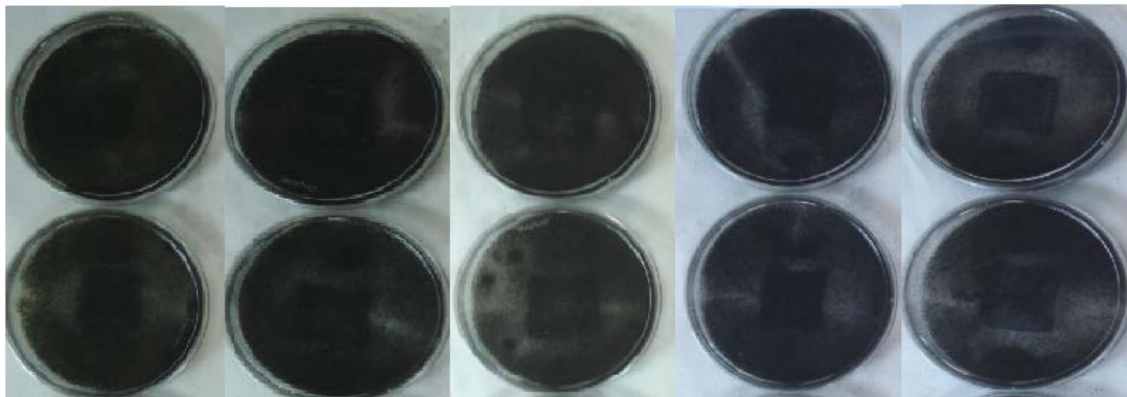


Figura A.5: Crescimento do fungo *Aspergillus niger* nas amostras de couros curtidos com os metabólitos dos fungos. Da esquerda para direita: Controle, *Aspergillus niger*, *Diplódia*, *Monascus purpureus* e *Fusarium graminearum*

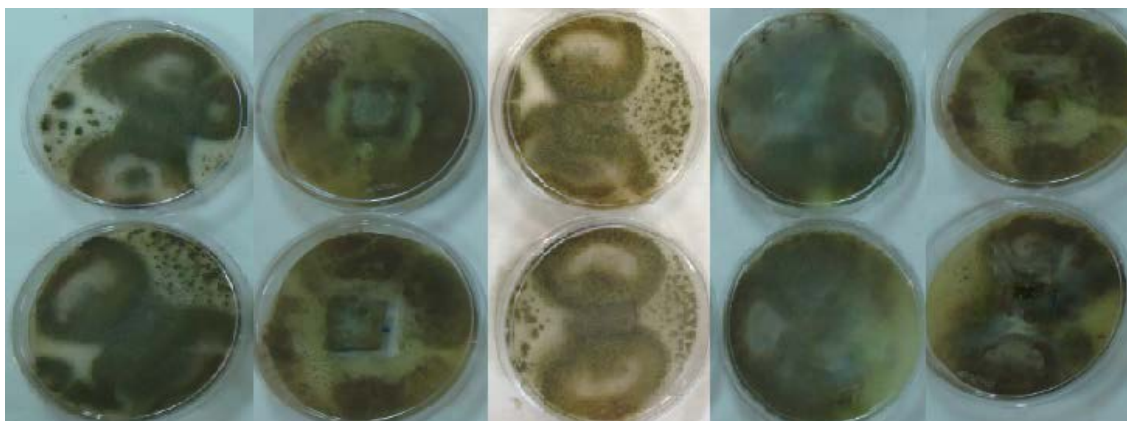


Figura A.6: Crescimento do fungo *Aspergillus flavus* nas amostras de couros curtidos com os metabólitos dos fungos. Da esquerda para direita: Controle, *Aspergillus niger*, *Diplódia*, *Monascus purpureus* e *Fusarium graminearum*

Analisando as Figuras A.5 e A.6, observa-se que os metabólitos secundários dos fungos *Aspergillus niger*, *Diplódia*, *Monascus purpureus* e *Fusarium graminearum* não apresentam ação fungicida contra o ataque dos fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*. Em apenas 3 dias de teste, todas as amostras de couro já estavam contaminadas com os fungos.

Conclusão

Para os testes realizados com os metabolitos secundários obtidos dos fungos *Monascus purpureus*, *Aspergillus niger*, *Diplódia* e *Fusarium graminearum* não foi observado ação fungicida dos mesmos quando aplicados no couro wet-blue. Algumas variáveis de processo podem ter interferido na produção de metabolitos antifúngicos, desde o meio de cultura onde foram incubados até a temperatura de controle.