



DESENVOLVIMENTO DE BIOCORANTES APLICADOS NA PRODUÇÃO DE COUROS

Wagner Fernando Fuck¹, Mariliz Gutterres¹, Maria Aparecida de Jesus²

¹Laboratório de Estudos em Couro e Meio Ambiente (LACOURO)

²Laboratório de Patologia da Madeira - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Departamento de Engenharia Química,
R. Eng. Luis Englert, s/n. Campus Central. CEP: 90040-040 - Porto Alegre - RS - BRASIL,

E-MAIL: {[wagnerff](mailto:wagnerff@enq.ufrgs.br), [mariliz](mailto:mariliz@enq.ufrgs.br)}@enq.ufrgs.br

Resumo: O desenvolvimento de biocorantes é de extrema relevância a fim de substituir corantes sintéticos utilizados na indústria do couro que podem apresentar potencial carcinogênico ao homem. Para tanto, fungos são promissoras fontes naturais alternativas a essas substâncias, porque podem crescer rapidamente e independem de condições sócio-climáticas para produção. Contudo, o objetivo deste trabalho consiste em desenvolver corantes naturais aplicados ao couro, conferindo as qualidades exigidas aos artigos e propondo matérias-primas tecnicamente viáveis e seguras à saúde humana. As culturas de fungos *Penicillium sp* (LPM 1473) e (LPM 1504) foram acessadas da Coleção de Culturas de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). Os fungos apresentam potencial biocorante, produzindo a cor vermelho rubi no meio de cultura. A partir destas culturas serão desenvolvidos bioprocessos para a produção de corantes por fermentação em cultivo em meio líquido, extração e purificação. Posteriormente, serão aplicados no tingimento de couro e avaliação das características de qualidade conferidas ao artigo. O tingimento com tais corantes pode vir a ser um grande avanço para a produção de artigos de couro e, aliado, aos conhecimentos de fisiologia de fermentação, engenharia metabólica e tecnologia genética podem ser alcançadas produções em escala industrial.

Palavras-chave: biocorantes, couro, tingimento.

1. Introdução

Couro é um denso tecido natural de fibras protéicas modificadas quimicamente e mecanicamente que consiste em cerca de 50 a 75% de sua massa em substâncias naturais da pele de animais (HEIDEMANN, 1993).

O processo de manufatura do couro compreende várias etapas, desde a concepção da matéria prima, limpeza e extração de substâncias orgânicas indesejadas, substituição da água por agentes curtentes e óleos até o acabamento final, tornando o material imputrescível e conferindo características sensoriais e de resistência necessárias. Para tanto, é empregada uma vasta e diversificada gama de produtos químicos, que implica a necessidade do uso racional e seguro de todos os insumos com o fim de evitar um impacto negativo ao homem e meio ambiente.

Praticamente, todos os couros são tingidos com substâncias sintetizadas (corantes artificiais), o que confere as propriedades estéticas determinantes para os diferentes tipos de artigo, tais como calçado, estofamento, automotivo, moveleiro, vestuário e acessórios. Neste contexto, o desenvolvimento de corantes ecologicamente corretos para tingimento é de relevância tecnológica, visando à produtividade na indústria e à segurança para aplicação em produtos de uso em contato direto com o corpo.

Biocorantes produzidos por fungos são alternativas ao uso de corantes sintéticos que podem apresentar efeitos tóxicos e potencial carcinogênico ao homem. São oriundos de fontes naturais de alta produtividade, a produção independente de efeitos sazonais e de simples controle de qualidade. Aliados aos conhecimentos de fisiologia de fermentação, engenharia metabólica e tecnologia genética podem ser alcançadas produções em escala industrial (MAPARI *et al.*, 2005; VELMURUGAN *et al.*, 2010a).

Os objetivos deste trabalho são estudar o cultivo, extração e purificação de corantes a partir de fungos, aplicação no tingimento de couro e avaliação das propriedades conferidas nos artigos.

1.1 Corantes e pigmentos e suas aplicações no processo de manufatura do couro

Corantes são geralmente moléculas orgânicas sintetizadas de natureza aromática ou heterocíclica e são classificadas pelo tipo de molécula básica a partir da qual são derivados. São substâncias solúveis em meio ácido, neutro ou básico, que possuem uma estrutura molecular não saturada, ou seja, eletricamente instáveis. São produtos capazes de conferir sua própria cor ao material sobre o qual se fixam (GUTTERRES, 2011). Muitos autores não diferem os termos “corantes” e “pigmentos”, mas devem ser tratados como substâncias distintas no processo de manufatura do couro.

A aplicação de corantes orgânicos solúveis em um banho aquoso de tingimento do couro leva à fixação das moléculas de corante tanto na superfície quanto no interior da rede de fibras curtidas. Este tipo de coloração de couro é completamente diferente da etapa de acabamento realizada na manufatura do couro *crust* (semi-acabado), na qual são aplicadas na superfície externa dos couros secos (lado da flor ou grão) corantes insolúveis e pigmentos juntamente com substâncias poliméricas aglutinantes (HEIDEMANN, 1993).

Pigmentos são partículas finamente divididas, insolúveis em água e que não têm afinidade química com a fibra, possuem menor poder tintorial e melhor estabilidade à luz e altas temperaturas, em comparação com os corantes (FRINHANI, 2003). No couro, os pigmentos são aplicados na etapa de acabamento conferindo as características finais de cor, toque e cobertura ao artigo. Para couros com aspecto visual natural, tais como couro anilina e camurça, não é usado acabamento com pigmento.

A molécula do corante é composta por grupos cromóforos (ou cromógenos) e auxócromos. A primeira confere a sua cor característica ao couro e a segunda fixa a molécula de corante à fibra de couro. Os grupos auxócromos são, em geral, grupos formadores de sal de cromo -NH₂ e -OH e seus derivados ou radicais solubilizantes como -COOH ou SO₃H (GUTTERRES, 2011).

Os principais grupos cromóforos e auxócromos presentes nas moléculas de corantes são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Principais grupos cromógenos e auxócromos.

Cromógeno	Auxócromo
Nitroso: -N=O	-OH
Nítro: -NO ₂	-NH ₂
Carbonila: C=O	-NR ₂
Carbono – nitrogênio: C=NH	-NHR
Azo: -N=N-	-OCH ₃
Enxofre: C=S e -C-S-S-C-	-NH-CO-CH ₃
Etileno: -C=C-	-NH-NH ₂

Fonte: Frinhan, 2003; Gutterres, 2011.

1.2 Exigências mercadológicas

Os corantes sintéticos são utilizados nos processos de tingimento devido à maior estabilidade térmica, resistência à luz e baixo custo. No entanto, alguns desses corantes sintéticos podem conter substâncias com potencial carcinogênico, apresentando risco à saúde quando em contato prolongado com o corpo.

Atualmente, já existem rigorosas exigências estabelecidas por legislações e selos ecológicos, principalmente no mercado da União Européia e Estados Unidos da América referente à comercialização de artigos de couro que contenham substâncias perigosas ou de uso restrito (AAFA, 2011; ECHA, 2011).

A Diretriz 2004/21/CE, em vigor desde 2005, limita a colocação no mercado europeu de artigos acabados de têxteis e couro, em quaisquer partes tingidas com corantes azóicos, que por clivagem redutora de um ou mais grupos “azo” (-N=N-), possam liberar determinadas aminas aromáticas. Esta Diretriz tem como principal objetivo proteger a saúde da população européia que, numa

exposição prolongada a estas substâncias, estaria suscetível a contrair câncer (CBI, 2011).

As exigências para controle de substâncias químicas perigosas em produtos de consumo, como calçado e artigos de couro, estão crescendo rapidamente. Uma lista restringe o uso de substâncias que possam estar presentes nos corantes sintéticos, tais como 24 aminas aromáticas derivadas de corantes azóicos, corantes dispersos e metais pesados (ADIDAS, 2010; FUCK *et al.*, 2008 e 2011).

Cerca de 70% de todos os corantes conhecidos na literatura com aplicação em couro e tecido possuem o grupo cromóforo “azo” e, na prática, mais de 90% dos couros em todo mundo são tingidos com corantes azo (PAGE, 2001).

1.3 Corantes naturais versus corantes sintéticos

Corantes naturais são alternativas importantes para substituir corantes sintéticos potencialmente prejudiciais ao homem (SIVAKUMAR *et al.*, 2009), possuem melhor biodegradabilidade e compatibilidade com o meio ambiente em relação aos corantes sintéticos (NAGIA, 2007) e possuem propriedades antioxidantes, antitumorais, antimicrobianas e anticarcinogênicas (SINGH, 2005; DE CARVALHO, 2011).

Mapari *et al.* (2010), ressaltam a necessidade de pesquisar a potencialidade de outras fontes biológicas, tais como fungos, bactérias e culturas de células, uma vez que a seleção adequada, mutação ou engenharia genética são susceptíveis a melhorar significativamente o rendimento da produção do pigmento em relação aos organismos selvagens.

Corantes naturais têm uma série de desvantagens que inviabilizam sua utilização, incluindo a dependência do fornecimento de matérias-primas e variações nos métodos de extração, agregando alto custo de produção (SIVAKUMAR *et al.*, 2009; INAYAT *et al.*, 2010) e apresentando baixa resistência à luz e calor (BORDIGNON *et al.*, 2011).

Microalgas são conhecidas como produtoras de ampla gama de pigmentos solúveis em água, mas a baixa produtividade das culturas é um gargalo limitante para a sua comercialização (HEJAZI *et al.*, 2004).

Os fungos são relatados como microrganismos produtores de pigmento (BABITHA *et al.*, 2007).

Pigmentos de fungos basidiomicetos foram utilizados no passado para tingir lã e seda (BESSETTE, 2001), mas tais fungos são difíceis de cultivar em laboratório e em condições de larga escala industrial (MAPARI *et al.*, 2010).

Os principais tipos de pigmentos naturais estão agrupados pelo tipo de estrutura básica (MORITZ, 2005):

- Porfirinas;
- Betalainas;
- Flavonóides
 - Antocianinas (cores azuis e vermelhas)
 - Antoxantinas (cores nos tons amarelos)
 - Leucoantocianidinas (incolores)
- Carotenóides;
- Taninos;
- Outros pigmentos (quinonas – ácido carmínico, polifenóis, *Monascus - Monascin*, etc.).

1.4 Biocorantes

De Carvalho (2011), destaca a grande variedade de corantes e pigmentos de produção microbiológica, tais como riboflavina, *monascus*, carotenoides (astaxantina, β -caroteno, etc.) e ficobiliproteínas (como ficocianina). Microalgas, tais como *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Scenedesmus*, *Spirulina sp.*, também são usadas na produção de corantes e pigmentos.

O gênero *Monascus* pertence à família *Monascaceae* (Ascomycetos), distribuído em três espécies: *M. pilosus*, *M. purpureus* e *M. ruber* (DAROIT, 2007).

Já é comprovado que biocorantes produzidos por fungos como *Monascus purpureus*, *Emericella spp.* e *Penicillium spp.* não apresentam efeitos tóxicos (YOUSSEF *et al.*, 2008; VELMURUGAN *et al.*, 2010a).

Os pigmentos obtidos do fungo *Monascus* formam um grupo de metabólitos secundários chamados azafilonas, produzindo seis tipos diferentes de pigmentos, divididos em três grupos: pigmento laranja, rubropunctatina ($C_{21}H_{22}O_5$) e monascorubramina ($C_{23}H_{26}O_5$); pigmento vermelho, rubropunctamina ($C_{21}H_{23}NO_4$) e monascubramina ($C_{23}H_{27}NO_4$) e pigmento amarelo, monascina ($C_{21}H_{26}O_5$) e ankaflavina ($C_{23}H_{30}O_5$) que são formas reduzidas dos dois pigmentos laranja. São largamente utilizadas na produção de alimentos (DUFOSSE *et al.*, 2005; DAROIT, 2007);

Moritz (2005) estudou a produção de pigmentos vermelhos formados por *Monascus ruber* CCT 3802 em cultivo submerso utilizando substratos de baixo custo da agro-indústria como alternativa para redução dos custos de produção, extração e purificação do produto final, além da

minimização da concentração de toxina (citrinina) formada juntamente com os pigmentos vermelhos.

Os pigmentos produzidos pelo *Monascus* possuem baixa solubilidade na água, são sensíveis ao calor e instáveis a valores extremos de pH (2,0 e 14,0) e exposição à luz. Estes pigmentos reagem rapidamente com grupamentos amino contido em proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos, formando complexos hidrossolúveis mantendo sua coloração estável por diversos meses quando conservados em solventes orgânicos (butanol). No entanto, em ele é degradado em poucos dias quando solução aquosa. O recente uso de ácido glutâmico como fonte de nitrogênio tem apontado resultados promissores como estimulante no acúmulo extracelular dos pigmentos, contribuindo para o aumento da eficiência do processo de produção de pigmentos vermelhos (HAJJAJ *et al.*, 2000).

Segundo Mapari *et al.* (2005), antocianinas são flavonóides caracterizados pela estrutura básica flavílio catiônica. Violeta, cores púrpuras de antocianinas, é sensível à oxidação, branqueamento por dióxido de enxofre e variam com o pH. Betaninas, carotenoides e pigmentos de clorofila contêm hidrogênios lábeis e são facilmente descoloridos por oxidação, tornando-os sensíveis à luz, calor e oxigênio. Estas características limitam a robustez desses aditivos de cor durante o processamento, armazenamento e visualização dos alimentos.

Na tabela 2 são apresentados estudos sobre fungos produtores de corantes.

Tabela 2. Fungos produtores de corantes.

Fontes fúngicas	Cor	Observações
<i>Fusarium oxysporum</i>	Roxo rosado	Compostos de antraquinona produzidos a partir de culturas estacionárias de <i>F. oxysporum</i> poderia ser usado para tingir lã com boas propriedades de solidez e alta absorção do corante ¹ .
<i>Penicillium spp.</i> (HKUCC 8070)	Vermelho	Poliquetéide <i>Monascus</i> , solúvel em água e termoestável ² .
<i>Penicillium spp.</i> (HSD07B)	Vermelho	O pH não teve efeito significativo sobre a cor do pigmento, tendo a cor máxima em pH 7. O pigmento é estável na faixa testada de 10 a 100°C ³ .
<i>Monascus Purpureus</i>	Vermelho	A condição otimizada de tingimento de couro foi em concentração de pigmento de 6%, pH 5, concentração de sal de 1,5 g/L, 120 min, temperatura 70°C, resultando na absorção máxima de pigmento de 94,70% (<i>M. purpureus</i>), 90% (<i>Penicillium spp.</i>), 79,8% (<i>Fusarium spp.</i>), 77% (<i>Emericella spp.</i>) e 81,6% (<i>Isaria spp.</i>) ⁴ .
<i>Isaria spp</i>	Marrom avermelhado	
<i>Emericella spp.</i>	Rosa (pink)	
<i>Fusarium spp</i>	Vermelho	
<i>Penicillium spp.</i>	Amarelo	
<i>Monascus spp.</i>		
• <i>Monascorubrin</i>	Laranja	Estável ao calor e pH, forma pigmentos vermelhos solúveis em água reagindo com amino ácidos do meio ⁵ .
• <i>Rubropunctatin</i>	Laranja	
• <i>Monascin</i>	Amarelo	
• <i>Ankaflavin</i>	Amarelo	
• <i>Monascusones</i>	Amarelo	
<i>Penicillium persicinum</i>	Rosa avermelhado	Grande quantidade de pigmento exógeno, ainda não caracterizado ⁵ .
<i>Penicillium fagi</i>	Azul esverdeado	Maior parte preso em micélio, ainda não caracterizados ⁵ .
<i>Epicoccum nigrum</i>		
• <i>Flavipin</i>	Amarelo	Solúvel em água, antioxidante, alto poder de coloração, relatado estimular produção de astaxantina em levedura ^{5,6} .
• <i>Orevactaene</i>	Laranja	
• <i>Desconhecido</i>	Amarelo	
<i>Paecilomyces sinclairii</i>	Vermelho a pH=3-4 Violeta a pH=5-9 Rosa a pH=10-12	Estável a luz, alta produção por cultivo submerso, necessário caracterização química ⁵ .

1.5 Estudos e desenvolvimentos de biocorantes

Uso de mordentes (FRINHANI, 2003; VELMURUGAN *et al.*, 2009; INAYAT *et al.*, 2010), e aplicação de agentes anti-oxidantes, como o tocoferol (LIU *et al.*, 2010; BORDIGNON *et al.*, 2011), assim como o desenvolvimento de novas fontes de corante de fungos mitospóricos são técnicas promissoras para viabilizar a aplicação de biocorantes na indústria de alimentos, tecidos e couro (WISSGOTT, 1999; ALVES, 2005; JIANG *et al.*, 2005; MAPARI, 2005; NAGIA *et al.*, 2007; SIVAKUMAR *et al.*, 2009; VELMURUGAN *et al.*, 2010 a,b,c; HAILEI *et al.*, 2011).

Segundo Inayat (2010), diferentes tons de cor podem ser obtidos no couro alterando o mordente utilizado. De acordo com seus estudos, o ácido oxálico utilizado como pós-mordente em tingimento com corantes naturais influencia as propriedades do couro, incluindo solidez da cor ao suor e solidez da cor à fricção.

Nos estudos de Velmurugan *et al.* (2010a), foi otimizado o potencial de tingimento de amostras de couros pré-curtidos com cinco corantes extraídos e purificados dos fungos *Monascus purpureus*, *Isaria spp.*, *Emericella spp.*, *Fusarium spp.*, e *Penicillium spp.* Os melhores resultados referentes à penetração e fixação de corante e intensidade da cor mostraram que a concentração ótima dos corantes foi de 6% sobre o peso de couro e a condição ideal de tingimento foi de 70°C, pH de 5,0 e tempo de 120 minutos de duração. A absorção máxima de corantes nas amostras de pele variou de (40 a 70 ± 0,2)% e as variações de tonalidades das amostras foram elevadas para o pigmento obtido de *M. purpureus*. Os pigmentos fúngicos não alteraram as propriedades organolépticas da amostra de couro.

Segundo Nagia *et al.* (2007), compostos de antraquinona, isolados a partir de cultura líquida de *Fusarium oxysporum* podem fornecer tons brilhantes, com boas propriedades de estabilidade da cor e podem servir como fonte notável de matéria-prima no futuro.

Um novo isolado de endófitos de plantas medicinais *Penicillium sp.* produziu um pigmento vermelho solúvel em água em meio de cultivo de batata dextrose, extrato de malte e um meio quimicamente definido contendo glutamato como fonte de nitrogênio (HKUCC 8070). O pigmento vermelho de policetídeo produzido por *Monascus* foi identificado como termoestável tendo maior rendimento obtido de 1107 mg.L⁻¹ (JIANG *et al.*, 2005).

Na natureza, a luz é um dos mais importantes fatores ambientais para regular os processos fisiológicos e de desenvolvimento em vários organismos, incluindo fungos filamentosos (ARDEN *et al.*, 1966; MIYAKE *et al.*, 2005).

Segundo Velmurugan *et al.* (2010b), a incubação em ausência total de luz aumentou a produção de biomassa, pigmentos extracelulares e intracelulares em todos os fungos estudados (*Monascus purpureus*, *Isaria farinosa*, *Emericella nidulans*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium purpurogenum*), seguido pelas luzes vermelho, azul, branca, verde e amarelo. Conforme estudos desenvolvidos pelo autor, a máxima produção de pigmento vermelho extracelular, intracelular e de biomassa por *M. purpureus* foi à condição de completa ausência de luz, obtendo os respectivos resultados de 36,75 ± 2,1 OD, 18,27 ± 0,9 OD/g de substrato e 2,51 g/L de peso seco. Da mesma forma, a mínima produção foi com luz amarela e os respectivos resultados foram: 5,90 ± 1,1 OD, 8,03 ± 0,6 OD/g de substrato 0,5 g/L de peso seco.

De acordo com o trabalho de Babitha *et al.* (2008), a incubação em total ausência de luz aumentou a produção

de pigmento vermelho da 14,5 OD/g de substrato seco para 22 OD/g de substrato seco. Em contraste, o crescimento do fungo em iluminação direta resultou na supressão total da produção de pigmentos.

Na figura 1 está apresentado o efeito de diferentes fontes de luz sobre a morfologia de *Monascus purpureus* quando incubados sob as seguintes fontes de iluminação: luz direta, ausência de luz, parcialmente exposto à luz, exposto à luz vermelha, à luz azul e à luz verde.

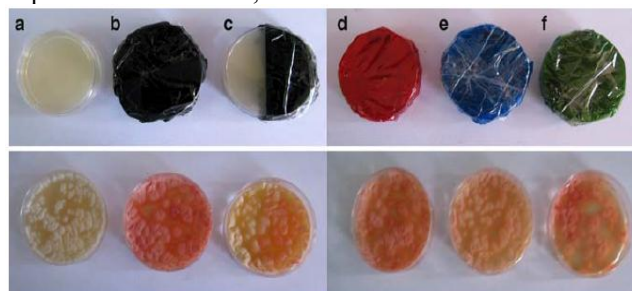


Figura 1: Efeito de diferentes fontes de luz sobre a morfologia de *Monascus purpureus* (a) exposição à luz direta, (b) ausência de luz, (c) parcialmente exposta à luz, (d) exposto à luz vermelha, (e) exposição à luz azul, (f) exposição à luz verde.

Fonte: Babitha *et al.*, 2008.

Tocoferóis são conhecidos agentes antioxidantes comumente utilizados nas indústrias de cosméticos e alimentos. Segundo Liu (2010), a mistura de tocoferóis é um eficiente aditivo para acabamento de couro isento de cromo, melhorando a estabilidade e viscoelasticidade contra danos causados por exposição a raios UV e calor.

Segundo Bordignon *et al.* (2011), verificou-se que o tipo de ácido usado como agente fixador (cítrico e fórmico), não apresentou diferenças significativas para a fixação dos corantes, a temperatura mais adequada foi de 50°C e a utilização de tocoferol na segunda adição do tingimento não acarretou em maior absorção de corante, mesmo tendo a cor ficado mais intensa.

1.6 Etapa de tingimento de couro

O tingimento é uma das etapas de acabamento do couro, usualmente realizada no acabamento molhado feito após o curtimento, na qual são aplicados corantes orgânicos aquosos com a finalidade de conferir cor constante e uniforme em toda a sua espessura e comprimento. Se a camada externa do couro, denominada como flor, for danificada com o uso, é importante que o interior seja da mesma coloração da superfície a fim de minimizar o impacto visual. O tingimento é um processo empregado para conferir ao couro a coloração desejada, melhorando o aspecto do artigo. Nesta etapa, como nas anteriores, devem ser favorecidas as condições de difusão e fixação do corante.

A fixação dos corantes é devido a reações químicas entre a molécula colagênica e a molécula do corante. As moléculas corantes mais utilizadas são as aniônicas, o que significa grande competição pelos sítios catiônicos do colágeno já que outras classes de insumos utilizados sobre o couro também são aniônicos. Por isso, deve-se promover no final do tingimento a acidificação do banho de tingimento a fim de promover a ionização de grupos amino do colágeno que reagirão com as do corante.

A reação de fixação do corante nas fibras colagênicas pela acidificação do banho de tingimento é apresentada na Figura 2:

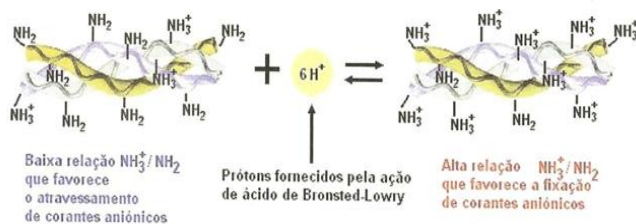


Figura 2. Reação de fixação do corante.

Fonte: Departamento de pesquisa e desenvolvimento da Mogiana (2007)

Segundo Gutierrez (2011), pressupõem-se os seguintes tipos de ligações:

1. Enlaces eletrostáticos ou enlaces salinos entre os grupos amino livres da proteína e os grupos sulfônicos dos corantes;
2. Ligações de hidrogênio entre os hidrogênios ativos do corante e os centros de alta densidade eletrônica sobre a proteína ou entre os hidrogênios ativos do couro e enlaces azo do corante;
3. Forças de Van der Waals estabelecidas entre corantes e proteína;
4. Enlaces covalentes coordenados entre o corante e o complexo de cromo.

Usualmente é procedida uma segunda etapa de adição de corante (remonte) com a finalidade de conferir maior intensidade de cor às fibras. Quando outro corante é oferecido no remonte, o primeiro corante não é lixiviado para fora.

2. Materiais e Métodos

2.1 Origem dos fungos produtores de corantes

Duas culturas de fungos foram acessadas da Coleção de Culturas de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). *Penicillium sp* (LPM 1473) apresenta crescimento micelial lento em meio de cultivo em extrato de malte ágar. A colônia é plana de coloração amarela à medida que a cultura se desenvolve e ao mesmo tempo há formação de pigmentos solúveis que difundem-se pelo meio, alterando a coloração da cultura para vermelho-rubi. A cultura do fungo (LPM 1504) cresce bastante lento, com uma colônia rarefeita de cor branca, produz pigmento da mesma cor, sendo que a produção do pigmento aumenta e a cor fica vermelho-escuro em baixa temperatura (COSTA & JESUS, 2010).

A partir destas culturas, serão desenvolvidos bioprocessos para a produção de corantes por fermentação em cultivo em meio líquido, extração e purificação dos corantes. Os corantes serão aplicados nas etapas de tingimento e acabamento de couro e as características conferidas ao artigo serão avaliadas. Os fungos isolados ainda serão devidamente identificados.

O procedimento inicial será realizado de acordo com o seguinte procedimento:

1. Cultivar em (100 ml) meio mineral de sais-glicose contendo, por litro de água deionizada, 30g glicose; 1,0g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,4g K_2HPO_4 ; 0,6g KH_2PO_4 ; 0,8mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,8mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,8mg $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,4mg $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,08mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; e pH=5,6 em frascos Haffins (JUDD &

WYESZCHI, 1975).

2. Incubar a 27°C em condições estacionárias durante 4 a 6 semanas (NAGIA *et al.*, 2007) e após o período de incubação, colher o micélio e filtrar o sobrenadante;

3. Adicionar dois volumes de etanol 95% (v/v) ao meio de cultura esgotado de acordo com o seguinte procedimento (VELMURUGA *et al.*, 2010a,b):

3.1 Diluir com aproximadamente 60% do volume de solvente requerido;

3.2 Agitar a mistura resultante em agitador rotatório a 180rpm e 30°C por 30min;

4. Centrifugar a mistura etanólica a 3780rpm por 15min;

5. Recuperar o sobrenadante, eluir o resíduo no volume restante de etanol e centrifugar novamente a 3780rpm por 5min;

6. Analisar o espectro de absorção entre 300–600nm usando espectrofotômetro UV-VIS;

7. Concentrar os pigmentos purificados em um evaporador rotatório Buchi.

3.3 Estudo dos fatores que influenciam no tingimento

Os biocorantes purificados serão aplicados na etapa de tingimento de couro.

Como há um grande número de classes de couros, as condições do processo de curtimento também variam e as possibilidades de usar um ou outro produto que afetará o colagênio de uma forma particular são muitas.

As propriedades sensoriais como pureza da tonalidade, intensidade da cor e uniformidade do tingimento são muito importantes e, muitas vezes, determinantes para o sucesso de um artigo de couro.

Os fatores que influenciam no tingimento são temperatura, volume do banho, dimensões do fulão, tipo de corante, tipo de curtimento e recurtimento.

Temperatura

Em geral, quanto menor a temperatura, menor a absorção e fixação do corante no couro. Muitos corantes formam agregados em soluções aquosas a temperaturas ambientes que possuem baixa afinidade com o couro, penetrando profundamente sem se fixar na superfície do couro. Com esses corantes é possível tingir com banhos mais curtos e aquecendo a solução em uma fase seguinte a fim de interromper estes agregados, promovendo a fixação das moléculas de corantes às fibras do interior do couro. Como consequência, obtém-se melhor homogeneidade da cor, porém cor superficial mais reduzida (HEIDEMANN, 1993).

Para garantir uma maior penetração e melhor uniformidade, os corantes devem ser aplicados em temperatura ambiente e para promover a maior fixação, melhor esgotamento e maior intensidade, deve-se trabalhar com temperaturas superiores a 60°C (MK QUÍMICA, 2002).

Acidez do banho de tingimento

A influência da acidez na afinidade do corante às fibras do couro varia de corante para corante. A desacidulação do couro a um pH mínimo de 5,5 previne uma oclusão superficial do corante no couro. Adições de amônia ao banho de tingimento para aumentar o pH para

aproximadamente 8 irá aumentar a homogeneidade da cor quando se usa corantes com alta afinidade. No entanto, elevar pH a valores demasiadamente altos pode reduzir a firmeza da flor.

Elevando o pH na fase inicial, seguido pela redução do pH no final pode ajudar a homogeneidade do corante, sem afetar a flor ou grão. A acidificação do banho de tingimento reduz a solubilidade do corante, que então começa a se ligar ao substrato.

Os corantes mais utilizados são os ácidos que possuem normalmente pH ligeiramente alcalino, fixando-se em meio ácido com pH em torno de 3,5. Então, quanto mais baixo for o pH, mais difícil será o atravessamento e maior será a intensidade na superfície.

Tempo de tingimento

A uniformidade do tingimento é essencialmente determinada em todo tipo de couro, pela velocidade com a qual os corantes montam sobre as fibras do couro.

Qualquer sistema que permita que a reatividade entre o corante e a superfície do couro seja muito rápida ou muito lenta resultará em um tingimento não uniforme. Um maior tempo de tingimento promove maior atravessamento, assim como tempos menores promovem tingimentos mais superficiais. Já no processo de fixação, quanto mais lentamente for conduzido, melhores serão os resultados (MK QUÍMICA, 2002). Normalmente o tempo de tingimento varia entre 30 a 40 minutos.

Volume do banho

Para obter-se um atravessamento melhor e mais rápido do corante deve-se trabalhar com um menor possível volume de banho, pois isto aumentará a ação mecânica e otimizará a difusão. Já com um volume de banho maior ter-se-á um efeito superficial melhor e uma maior uniformidade.

Maior diluição, isto é, banho mais longo, tem como efeito velocidade de montagem menor e maior uniformidade (BASF S.A., 2004).

Trabalho mecânico

Quanto maior o trabalho mecânico, melhor será o atravessamento do corante em função do efeito de bombeamento do banho para o interior do couro (MK QUÍMICA, 2002).

Tipo de curtimento e recurtimento

Como a maioria dos corantes utilizados atualmente tem caráter aniônico e, portanto, tem uma grande afinidade com o complexo de cromo, a má distribuição do cromo no curtimento pode levar à formação de manchas no tingimento.

Os recurentes influenciam na intensidade, tonalidade e atravessamento do tingimento, pois atuam nos mesmos pontos de ligação dos corantes ou por interagirem com eles através de sua carga (normalmente aniônica).

Agentes auxiliares

A utilização de produtos auxiliares na etapa de tingimento tem o objetivo de melhorar a aplicação dos corantes e características específicas no couro tingido. Produtos auxiliares de tingimento podem ser diferenciados de acordo com a afinidade pelo couro ou pelo corante

visando tingimento de alta uniformidade.

3.4 Testes de controle e análises quantitativas

Na etapa de tingimento do couro são realizados inúmeros testes de controle e análises quantitativas, que permitem tanto padronizar quanto agregar diferentes características ao produto.

Serão efetuados os testes de controles da etapa de tingimento conforme descritos na tabela 3.

Tabela 3. Testes rápidos de controles da etapa de tingimento

Testes de controle	Observações
pH	Fundamental para garantir a condição ideal para difusão e posterior fixação dos corantes às fibras colagênicas do couro.
Atravessamento	Um pedaço da amostra é cortado, revelando o quanto o corante penetrou no couro. Se não for satisfatório, ou seja, se o corante não estiver distribuído em toda a área transversal do couro, o processo de tingimento deve continuar.
Cor e igualização de tonalidades	Ao final da etapa de tingimento, o couro é seco e deve apresentar tingimento uniforme em toda a área superficial (flor).
Esgotamento de corante no banho	A exaustão do corante do banho no decorrer do tempo de tingimento reflete a absorção do corante pelo couro e pode ser quantificada diretamente pela cor remanescente no banho por análise visual e por leituras em espectrofotômetro UV-Vis.

Após a etapa de tingimento, serão procedidas as análises apresentadas na Tabela 4 para comprovar se a amostra tingida está nos padrões exigidos para os variados tipos de artigos de couro.

Tabela 4. Análise do artigo final.

Análises quantitativas	Observações
<ul style="list-style-type: none"> Solidez à luz 	Está diretamente relacionada com o tipo de corante (grupo cromóforo). Solidez de maior interesse na seleção de corantes para produção de couros pouco ou não pigmentados.
<ul style="list-style-type: none"> Solidez ao suor Solidez à lavagem 	Amostra de couro é mantida em contato com algodão e lã não tingidos e agitada por 30min em uma solução neutra de lauril sulfato de sódio a 30°C e, após, avaliada de acordo com escala de cinzas.
<ul style="list-style-type: none"> Migração ao PVC 	É a transferência de cor de uma amostra de couro tingido quando colocado em contato com PVC sob pressão de 0,75 kgf/cm ² avaliada de acordo com a escala de cinzas.

4 Conclusões

As referências bibliográficas demonstram que fungos são promissoras fontes naturais produtoras de corantes alternativas aos corantes sintéticos, que podem apresentar efeitos tóxicos e potencial carcinogênico ao homem.

A produção de corantes por fungos não é agressiva ao meio ambiente, independe de atividades extrativistas de recursos de água e solo e do uso de produtos químicos agrícolas.

Por fim, o desenvolvimento de tingimento com tais corantes pode vir a ser uma alternativa segura e até mesmo um grande avanço para a produção de artigos de couro.

5 Referências

AAFA - AMERICAN APPAREL & FOOTWEAR ASSOCIATION, Restricted Substance List, v. 8, 2011;

ADIDAS - Adidas group policy for the control and monitoring of hazardous substances – A01, v. 8, 2010;

ALVES, R.W., Extração de corantes de urucum por processos adsorptivos utilizando argilas comerciais e coloidal gas aphrons, Tese de doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da UFSC, 2005;

ARDEN, G.B., IKEDA, H., SIECEL, I.M., New components of the mammalian receptor potential and their relation to visual photochemistry, *Vision Research*, v. 6, n. 4, p. 373-384, 1966;

BABITHA, S., SOCCOL, C.R., PANDEY, A., Effect of stress on growth, pigment production and morphology of *Monascus sp.* in solid cultures, *Journal of Basic Microbiology*, v. 47, n. 2, p. 118-126, 2007;

BABITHA, S., CARVAHLO, J.C., SOCCOL, C.R., PANDEY, A., Effect of light on growth, pigment production and culture morphology of *Monascus purpureus* in solid-state fermentation, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, n. 11, p. 2671-2675, 2008;

BASF S.A, Vademécum do curtidor, ed. 4, p.157-192, 2004;

BESSETTE AR, BESETTE AE: The rainbow beneath my feet: a mushroom dyer's field guide. New York: University Press, 2001;

BORDINGNON, S., FUCK, W. F., GUTTERRES, M., VELHO, S. K., SCHOR, A. V., COOPER. M., BRESOLIN, L., Novel natural dyes for eco-friendly leather articles, XXX Congresso IULTCS, Espanha, 2011;

CBI - Centre for the Promotion of Imports from developing countries, Market Information Database, EU legislation: Azo dyes in textile and leather products, acesso em 12/05/2011, disponível em <http://www.cbi.eu>;

COSTA, J. S., JESUS, M. A., Seleção e isolamento de fungos lignocelulolíticos, anais do 3º Congresso sobre Diversidade Microbiana da Amazônia (CDMicro) e XII Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental (ENAMA), Manaus, 2010;

DAROIT, J.D., Production of extracellular b-glucosidase by *Monascus purpureus* on different growth substrates, *Process Biochemistry*, n. 42 p. 904-908, 2007;

DE CARVALHO, J. C., Perspectivas do uso de biocorantes na indústria de alimento, VII SIAL, Simpósio de Alimentos para a Região Sul - UPF, 2011. Disponível em: <http://www.upf.br/sial2011/download/Biopigmentos->

[Julio_C_Carvalho.pdf](#), acesso em 12/09/2011;

DEPARTAMENTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DA MOGINANA, A físico-química da fixação, *Revista do couro*, n. 189, p. 96-100, 2007;

DUFOSSE, L., GALAUP, P., YARON, A., ARAD, S. M., BLANC P., MURTHY, K.N.C., RAVISHANKAR, G.A., Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?, *Trends in Food Science & Technology*, v.16, p. 389-406, 2005;

ECHA - EUROPEAN CHEMICALS AGENCY, disponível em http://echa.europa.eu/home_en.asp, acesso em setembro de 2011;

FRINHANI, E.M.D., Estudos de aplicação de corantes naturais (norbixina, curcumina e clorofilina cúprica) para produção de papéis, Tese de doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal da Universidade Federal de Viçosa, 2003;

FUCK, W. F., GUTTERRES, M., Produtos químicos perigosos e de uso restrito no couro, XVII Congresso Latino-Americano dos Químicos e Técnicos do Couro, Rio de Janeiro, 2008;

FUCK, W. F., GUTTERRES, M., MARCÍLIO, N. R., BORDINGNON, S., The influence of chromium supplied by tanning and wet finishing processes on the formation of Cr (VI) in leather, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 28, n. 2, p. 221-228, 2011;

GUTTERRES, M., Apostila de aula - Tingimento de couros, Departamento de Engenharia Química – UFRGS, 2011;

HAILEI, W., ZHIFANG, R., PING, L., YANCHANG, G., GUOSHENG, L., JIANMING, Y., Improvement of the production of a red pigment in *Penicillium sp.* HSD07B synthesized during co-culture with *Candida tropicalis*, *Bioresource Technology*, v. 102, n. 10, p. 6082-6087, 2011;

HAJJAJ, H., BLANC, P., GROUSSAC, E., URIBELARREA, J.-L., GOMA, G., LOUBIERE, P., Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, n. 8, p. 619-625, 2000;

HEIDEMANN, E., *Fundamentals of Leather Manufacture*, ISBN 3-7929-0206-0, 1993;

HEJAZI, M.A., WIJFFELS, R.H., Milking of microalgae, *Trends in Biotechnology*, v. 22, n. 4, p. 189-194, 2004;

INAYAT, A., KHAN, S.R., WAHEED, A., DEEBA, F., Applications of eco friendly natural dyes on leather using different modrants, *Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences* v. 47, n. 3, p. 131-135. 2010;

JIANG, Y., LI, H.B., CHEN, F., HYDE, K.D., Production potential of water-soluble *Monascus* red pigment by a newly isolated *Penicillium sp.*, *Journal of Agricultural Technology*, 2005;

JUDD, D. B., & WYESZCHI, G., *Colour in business science and industry*, ed. 3, New York: John Wiley, 1975;

LIU, C.-K., LATONA, N.P., DIMAIO, G.L., COOKE, P., Polymeric coatings containing antioxidants to improve UV and heat resistance of chrome-free leather,

Journal of the American Leather Chemists Association, v. 103, n. 6, p. 167-175, 2008;

LIU, C.-K., LIU, L., LATONA, N.P., MILA, A.-R., LATONA, R.J., The use of mixed tocopherols to improve UV and heat resistance of leather, Journal of the American Leather Chemists Association, v. 105, n. 1, p. 9-15, 2010;

MACHADO, A.P., VIVI, V.K., TAVARES, J.R., FILHO, F.J.G., FISCHMAN, O., Antibiosis and dark-pigments secretion by the phytopathogenic and environmental fungal species after interaction in vitro with a *Bacillus subtilis* isolate, Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 53, n. 5, p. 997-1004, 2010;

MAPARI, S.A.S., NIELSEN, K.F., LARSEN, T.O., FRISVAD, J.C., MEYER, A.S., THRANE, U., Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants, Current Opinion in Biotechnology, v. 16, n. 2, p. 231-238, 2005;

MAPARI, S.A.S., THRANE, U., MEYER, A.S., Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? Trends in Biotechnology, v. 28, n. 6, p. 300-307, 2010;

MIYAKE, T., MORI, A., KII, T., OKUNO, T., USUI, Y., SATO, F., SAMMOTO, H., KARIYAMA, M., Light effects on cell development and secondary metabolism in *Monascus*, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 32, n. 3, p. 103-108, 2005;

MK QUÍMICA, Fatores que influenciam no tingimento, Revista do Couro, n. 156, p. 36-39, 2002;

MORITZ, D.E., Produção do pigmento monascus por *Monascus ruber* CCT 3802 em cultivo submerso, Tese de doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFSC, 2005;

NAGIA, F.A., EL-MOHAMEDY, R.S.R., Dyeing of wool with natural anthraquinone dyes from *Fusarium oxysporum*, Dyes and Pigments, v. 75, n. 3, p. 550-555, 2007;

PAGE, C., What are leather dyes today? The relationship between the dye structure and its performance properties, XXVI IULTCS Congress Proceedings, Cape Town, 2001;

SIVAKUMAR, V., ANNA, J.L., VIJAYEESWARRI, J., SWAMINATHAN, G., Ultrasound assisted enhancement in natural dye extraction from beetroot for industrial applications and natural dyeing of leather, Ultrasonics Sonochemistry, v. 16, n. 6, p. 782-789, 2009;

SINGH, R., JAIN, A., PANWAR, S., GUPTA, D., KHARE, S.K., Antimicrobial activity of some natural dyes, Dyes and Pigments, v. 66, n. 2, p. 99-102, 2005;

VELMURUGAN, P., CHAE, J., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P., YUN, B., LEE, K., OH, B., Assessment of the dyeing properties of pigments from five fungi and anti-bacterial activity of dyed cotton fabric and leather, Coloration Technology, v. 125, n. 6, p. 334-341, 2009;

VELMURUGAN, P., KAMALA-KANNAN, S., BALACHANDAR, V., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P., CHAE, J.-C., OH, B.-T., Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather, Carbohydrate Polymers, v. 79, n. 2, p. 262-268, 2010a;

VELMURUGAN, P., LEE, Y.H., VENIL, C.K., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P., CHAE, J.-C., OH, B.-T., Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium, Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 109, n. 4, p. 346-350, 2010b;

VELMURUGAN, P., KIM, M.-J., PARK, J.-S., KARTHIKEYAN, K., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P., LEE, K.-J., PARK, Y.-J., OH, B.-T., Dyeing of cotton yarn with five water soluble fungal pigments obtained from five fungi, Fibers and Polymers, v. 11, n. 4, p. 598-605, 2010c;

YOUSSEF, M.S., EL-MAGHRABY, O.M.O., & IBRAHIMM, Y.M., Mycobiota and mycotoxins of egyptian peanut (*arachis hypogaea* L.) seeds, International Journal of Botany, v. 4, p. 349-360, 2008;

WISSGOTT, U., BORTLIK, K., Prospects for new natural food colorants, Trends in Food Science and Technology, v. 7, n. 9, p. 298-302, 1996.