

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

**Seleção de Biocorantes de Fungos  
Filamentosos para Tingimento de Couro e  
Cultivo Submerso de *M. purpureus* com  
Substrato de Pelo Hidrolisado**

TESE DE DOUTORADO

Wagner Fernando Fuck

**Porto Alegre**

**2018**

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

**Seleção de Biocorantes de Fungos  
Filamentosos para Tingimento de Couro e  
Cultivo Submerso de *M. purpureus* com  
Substrato de Pelo Hidrolisado**

Wagner Fernando Fuck

Tese de Doutorado apresentado como requisito  
parcial para obtenção do título de Doutor em  
Engenharia

Área de concentração: Pesquisa e  
Desenvolvimento de Processos

**Orientadores:**

**Prof.<sup>ª</sup>. Dra. Mariliz Gutterres Soares**

**Prof. Dr. Adriano Brandelli**

**Porto Alegre**

**2018**

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 Tese de Doutorado *Seleção de Biocorantes de Fungos Filamentosos para Tingimento de Couro e Cultivo Submerso de M. purpureus com Substrato de Pelo Hidrolisado*, elaborado por Wagner Fernando Fuck, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Dr. Carlos Rodolfo Wolf

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Caroline Borges Agustini

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gertrudes Corção

## **Agradecimentos**

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

Aos meus orientadores, professora Mariliz Gutterres Soares e professor Adriano Brandelli pela orientação e amizade.

À minha esposa, pelo apoio, incentivo, força e compreensão em todos os momentos.

À minha mãe e ao meu irmão, que estão sempre ao meu lado, fazendo parte de todas as minhas conquistas.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Estudos em Couro e Meio Ambiente (LACOURO) pela ajuda e conselhos ao longo deste trabalho.

Ao CNPQ e CAPES pelo financiamento desta pesquisa.

## Resumo

A crescente restrição ao uso de certos corantes artificiais perigosos na fabricação de bens de consumo é um complexo desafio à indústria coureira que busca opções seguras à saúde humana, ambientalmente corretas, viáveis economicamente e que garantam as características exigidas ao artigo tingido. A maioria dos corantes naturais com potencial para utilização industrial é de fonte vegetal que requer grandes áreas de plantio e longo tempo de cultivo. Além disso, sabe-se que as características de tonalidade e estabilidade da cor à ação de fatores como luz e calor, bem como o custo e rendimento de produção são geralmente limitantes para a aplicação em couro. O objetivo deste trabalho é selecionar biocorantes produzidos por fungos filamentosos para tingimento de couro e desenvolver um substrato de pelo hidrolisado para produção de biocorante por cultivo submerso de *M. purpureus*. Para tanto, foram selecionados nove fungos filamentosos, os quais foram reativados em placas de Petri e incubados para cultivo submerso em meio aquoso com batata dextrose. Os biocorantes produzidos foram extraídos por filtração e concentrados em evaporador rotatório a vácuo a 2% de sólidos totais. As caracterizações dos biocorantes e da produtividade foram determinadas por colorimetria, espectroscopia de infravermelho (FTIR) e ultravioleta visível (UV-vis). O tingimento de couro foi realizado em escalas de laboratório e piloto e a estabilidade de cor das amostras tingidas foi analisada de acordo com a escala de cinzas. Dentre os biocorantes selecionados, o extrato de *M. purpureus* apresentou a maior produtividade e foi eficiente no tingimento do couro, apresentando bom poder de cobertura, penetração e boa propriedade de estabilidade de cor, exceto sob ação de luz UV. A melhor condição adotada para tingimento em escala piloto, com absorção superior a 94 % de corante pelo couro, foi com uma etapa de adição de biocorante a temperatura ambiente, ajuste da desacidulação pH 5,0, fixação com ácido fórmico e uso de auxiliar de tingimento. Ainda, a hidrólise de pelo bovino com HCl 6 N por 24 h a 60 °C e ajuste de pH a 6,5 com NaOH 6 N demonstrou ser um procedimento eficiente para preparação de substrato para cultivo submerso, resultando em maior produção de biocorante de *M. purpureus* do que os substratos comerciais de Dextrose e Batata Dextrose.

## Abstract

The increasing restriction of the use of certain dangerous artificial dyestuff in the production of consumer goods is a complex challenge to the leather industry which searches for safe, environmentally correct and economically viable alternatives to the human health and that assures the characteristics required to the dyed articles. The vast majority of the natural dyes known with potential to the industrial use is of vegetal source which requires a large plantation area and a long period of cultivation. Besides, the characteristics of shades and color stability to the action of factors like light and heat as well as the cost and performance of production are usually limited to the use in leather. The objective of this work is to select biodyes produced by filamentous fungi as secondary metabolites to the leather dyeing and develop a substrate of hydrolyzed hair to the production of biodyes by submerged cultivation of *M. purpureus*. To do so, nine filamentous fungi were selected, reactivated in Petri dishes and incubated in submerged cultivation in aqueous medium with potato dextrose. The biodyes produced were extracted by filtration and concentrated in vacuum rotatory evaporator in 2% of total solids. The characterizations of the biodyes and the productivity were determined by colorimetric testing, infrared spectroscopy (FTIR) and ultraviolet-visible spectroscopy (UV-vis). The leather dyeing was made in laboratory and pilot scales and the changes of the dyed sample colors were analyzed according to grey scales. Among the biodyes selected, the *M. purpureus* extract presented the higher productivity and was efficient in the leather dyeing, presenting good coverage of color, penetration and good property of color stability, except in the UV light exposition. The best adopted condition for pilot scale dyeing, with dye absorption above 94% by the leather, was with one addition of biodye in room temperature, adjustment of deacidulation pH 5.0, fixation with formic acid and use of auxiliary dyeing. Still, the bovine hair hydrolysis with HCl 6N for 24 h at 60 °C and pH adjust in 6.5 with NaOH 6 N, demonstrated being an efficient procedure to the substrate preparation to the submerged cultivation, resulting in higher *M. purpureus* biodye production than the commercial substrates of Dextrose and Potato Dextrose.

# Sumário

<b>Sumário .....</b>	<b>vii</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivos do trabalho .....	3
1.2 Estrutura do trabalho .....	4
<b>Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>5</b>
2.1 Fungos filamentosos.....	5
2.1.1 Métodos de cultivo.....	7
2.1.2 Métodos de identificação e caracterização de fungos filamentosos e metabólitos.....	9
2.2 Corantes .....	13
2.2.1 Classificação de corantes .....	14
2.2.2 Corantes utilizados no couro .....	20
2.2.3 Corantes naturais .....	22
2.2.4 Mercado de corantes naturais .....	23
2.2.5 Corantes fúngicos .....	24
2.3 Pele e e processamento em couro.....	28
2.3.1 Etapas de produção do couro.....	29
2.4 Etapas de estudo do processamento do couro.....	33
2.4.1 Depilação e caleiro da pele.....	33
2.4.2 Tingimento de couro.....	35
2.4.2.1 Fatores que influenciam o tingimento.....	37
2.4.2.2 Controle das características exigidas aos couros tingidos .....	39
2.4.2.3 Estudos de tingimento de couro.....	41
<b>Artigo de revisão: Leather Dyeing with Biodyes from Filamentous Fungi .....</b>	<b>45</b>
<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>47</b>
4.1 Fungos filamentosos.....	47
4.1.1 Fungos filamentosos selecionados.....	47
4.1.2 Identificação molecular do fungo LPM 1473.....	48
4.1.2.1 Extração do DNA genômico .....	48
4.1.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	49
4.1.2.3 Sequenciamento das amostras .....	50
4.1.2.4 Edição e análise das sequências.....	50
4.2 Produção de biocorantes .....	50
4.2.1 Preparação de culturas reativadas dos fungos filamentosos e preparação das suspensões de esporos para inoculação .....	50
4.2.2 Cultivo submerso .....	51
4.2.3 Determinação da densidade óptica .....	52
4.2.4 Análise colorimétrica .....	52
4.2.5 Análise de espectroscopia no Infravermelho por FTIR .....	52
4.3 Testes de tingimento do Couro .....	53
4.3.1 Teste de condições de tingimento em escala de bancada.....	53

4.3.2 Tingimento em escala piloto .....	55
4.3.3 Absorção de corante pelo couro .....	55
4.3.4 Testes de estabilidade da cor .....	56
4.3.4.1 Estabilidade da cor à luz ultravioleta .....	56
4.3.4.2 Estabilidade térmica .....	56
4.3.4.3 Estabilidade à migração para PVC plastificado .....	56
4.3.5 Verificação da presença de fungo nos couros tingidos .....	57
4.4 Cultivo submerso com pelo hidrolisado como substrato.....	57
4.4.1 Origem e caracterização do resíduo .....	58
4.4.2 Preparação do pelo hidrolisado .....	59
4.4.3 Cultivo submerso de <i>Monascus purpureus</i> com substrato de pelo bovino hidrolisado .....	59
<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>61</b>
5.1 Seleção de fungos filamentosos produtores de biocorantes .....	62
5.1.1 Identificação molecular do fungo LPM 1473.....	62
5.1.2 Cultivo em placas de petri.....	63
5.1.3 Cultivo submerso .....	64
5.1.4 Caracterização dos biocorantes por FTIR e UV-vis .....	67
5.1.4.1 Caracterização do substrato caldo batata-dextrose .....	67
5.1.4.2 Biocorante de <i>Monascus purpureus</i> .....	68
5.1.4.3 Biocorante de <i>Aspergillus niger</i> .....	70
5.1.4.4 Biocorante de <i>Penicillium herguei</i> .....	72
5.1.4.5 Biocorante de <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	73
5.1.4.6 Biocorante de <i>Penicillium vasconiae</i> .....	75
5.1.5 Caracterização da produção de biocorante por cultivo submerso .....	77
5.1.5.1 Biocorante de <i>Monascus purpureus</i> NRRL1992.....	77
5.1.5.2 Biocorante de <i>Aspergillus niger</i> IFL5.....	79
5.1.5.3 Biocorante de <i>Penicillium herguei</i> .....	80
5.2 Tingimento de couro com biocorante de <i>M. purpureus</i> .....	82
5.2.1 Testes de formulação de tingimento em escala bancada.....	82
5.2.2 Testes da formulação de tingimento em escala piloto .....	86
5.2.3 Determinação da resistência da cor nas amostras tingidas.....	87
5.2.4 Determinação da presença de fungo nos couros tingidos .....	88
5.3 Utilização de pelo hidrolisado como meio de cultura .....	90
<b>Conclusões.....</b>	<b>99</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>103</b>



## Lista de figuras

<b>Figura 2.1:</b> Espectro FTIR característico dos fungos analisados, incluindo cepa de diferentes <i>Aspergillus</i> spp, <i>Fusarium</i> spp, <i>Penicillium</i> spp e outros .....	10
<b>Figura 2.2:</b> Espectro FTIR dos fungos <i>Rhizoctonia</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Verticillium</i> e <i>Fusarium oxysporium</i> . .....	11
<b>Figura 2.3:</b> Espectro de FTIR do biocorante de <i>Monascus purpureus</i> .....	11
<b>Figura 2.4:</b> Tonalidades conferidas pelo corante emodina em madeira. ....	25
<b>Figura 2.5:</b> Efeito do pH sobre o estado de carga de proteína de colágeno. ....	29
<b>Figura 2.6:</b> Etapas do processamento do couro. ....	32
<b>Figura 2.7:</b> Reação de fixação de corante aniônico com a pele. ....	36
<b>Figura 4.1:</b> Sistema de fulão utilizado nos tingimentos de bancada .....	53
<b>Figura 5.1:</b> Eletroforese em gel de agarose mostrando os produtos de PCR da região ITS (A) e o gene parcial $\beta$ -tubulina (B). ....	62
<b>Figura 5.2:</b> Culturas reativadas dos fungos filamentosos (a) <i>A.niger</i> , (b) <i>Penicillium chrysogenum</i> , (c) <i>P.herguei</i> , (d) <i>Chaetomium aureum</i> , (e) LPM 1504,..... (f) <i>Monascus purpureus</i> , (g) <i>P. vasconiae</i> , (h) <i>F. oxysporium</i> e ..... (i) <i>Fusarium graminearum</i> cultivados em placas de petri. ....	64
<b>Figura 5.3:</b> Cultivo submerso com caldo batata dextrose dos fungos filamentosos (a) <i>A. niger</i> , (b) <i>P. chrysogenum</i> , (c) <i>P. herguei</i> , (d) <i>Chaetomium aureum</i> , (e) LPM 1504, (f) <i>M. purpureus</i> e (g) <i>P. vasconiae</i> .....	65
<b>Figura 5.4:</b> Biocorante extraído e concentrado de (a) <i>A. niger</i> , (b) <i>P. chrysogenum</i> , (c) <i>P. herguei</i> , (d) <i>Chaetomium aureum</i> , (e) LPM 1504, (f) <i>M. purpureus</i> e <i>P. vasconiae</i> . ....	65
<b>Figura 5.5:</b> Espectro de FTIR do caldo batata dextrose utilizado nos cultivos. ....	68
<b>Figura 5.6:</b> Espectro FTIR do biocorante de <i>Monascus purpureus</i> . ....	69
<b>Figura 5.7:</b> Metabólitos secundários formados pelo fungo <i>Monascus purpureus</i> .....	69
<b>Figura 5.8:</b> Espectro UV-visível do biocorante de <i>Monascus purpureus</i> .....	70
<b>Figura 5.9:</b> Espectro FTIR do biocorante de <i>Aspergillus niger</i> .....	71
<b>Figura 5.10:</b> Espectro UV-visível do biocorante de <i>Aspergillus niger</i> .....	71
<b>Figura 5.11:</b> Espectro FTIR do biocorante de <i>Penicillium herguei</i> . ....	72
<b>Figura 5.12:</b> Metabólito secundário formado pelo fungo filamentoso <i>P. herguei</i> .....	73
<b>Figura 5.13:</b> Espectro UV-visível do biocorante de <i>Penicillium herguei</i> .....	73
<b>Figura 5.14:</b> Espectro FTIR do biocorante de <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	74
<b>Figura 5.15:</b> Metabólitos secundários formados pelo fungo <i>P. chrysogenum</i> .....	74
<b>Figura 5.16:</b> Espectro UV-visível do biocorante de <i>Penicillium chrysogenum</i> . ....	75
<b>Figura 5.17:</b> Espectro FTIR do biocorante de <i>Penicillium vasconiae</i> .....	75
<b>Figura 5.18:</b> Espectro UV-vis do biocorante de <i>Penicillium vasconiae</i> .....	76
<b>Figura 5.19:</b> Produção biocorante extracelular por cultivo submerso de <i>M. purpureus</i> ..	78
<b>Figura 5.20:</b> Produtividade do biocorante extracelular de <i>M. purpureus</i> .....	78
<b>Figura 5.21:</b> Produção biocorante extracelular por cultivo submerso de <i>A. niger</i> .....	79
<b>Figura 5.22:</b> Produtividade de biocorante extracelular de <i>A. niger</i> .....	80
<b>Figura 5.23:</b> Produção biocorante extracelular por cultivo submerso de <i>P. herguei</i> .....	81
<b>Figura 5.24:</b> Produtividade de biocorante extracelular de <i>P. herguei</i> .....	81
<b>Figura 5.25:</b> Amostra de couro tingido em escala de bancada com uma etapa de adição de biocorante extraído de <i>Monascus purpureus</i> .....	85
<b>Figura 5.26:</b> Amostra de couro tingido em escala de bancada com duas etapas de	

	adição de biocorante extraído de <i>Monascus purpureus</i> .....	85
<b>Figura 5.27:</b>	Amostra de couro tingido em escala piloto com uma etapa de adição de biocorante extraído de <i>Monascus purpureus</i> .....	86
<b>Figura 5.28:</b>	Culturas encontradas no couro tingido com biocorante <i>M. purpureus</i> .....	89
<b>Figura 5.29:</b>	Culturas encontradas no couro tingido com corante comercial .....	90
<b>Figura 5.30:</b>	Cultivo submerso de <i>Monascus purpureus</i> com o substrato de pelo hidrolisado, comparativamente com meios comerciais .....	91
<b>Figura 5.31:</b>	Comparativo dos espectros UV-vis do biocorante de <i>M. purpureus</i> cultivado com os diferentes meios de cultura .....	94
<b>Figura 5.32:</b>	Espectro UV-vis do biocorante de <i>Monascus purpureus</i> cultivado em solução aquosa de pelo hidrolisado a pH 6,5 como meio de cultura .....	95
<b>Figura 5.33:</b>	Espectro UV do biocorante de <i>Monascus purpureus</i> cultivado em solução aquosa de pelo hidrolisado a pH 3,0 como meio de cultivo .....	95
<b>Figura 5.34:</b>	Espectro UV-vis do biocorante de <i>Monascus purpureus</i> cultivado em solução aquosa de pelo bruto moído como meio de cultura .....	96
<b>Figura 5.35:</b>	Espectro UV-vis do biocorante de <i>Monascus purpureus</i> cultivado em solução aquosa de Batata Dextrose comercial como meio de cultura.....	96
<b>Figura 5.36:</b>	Espectro UV-vis do biocorante de <i>Monascus purpureus</i> cultivado em solução aquosa de Peptona comercial como meio de cultura.....	97
<b>Figura 5.37:</b>	Espectro UV do biocorante de <i>M. purpureus</i> cultivado em solução aquosa de Peptona e Batata Dextrose comercial como meio de cultura .....	97
<b>Figura 5.38:</b>	Espectros UV do biocorante de <i>Monascus purpureus</i> cultivado em solução aquosa de dextrose comercial como meio de cultura .....	98

## Lista de tabelas

<b>Tabela 2.1:</b> Principais estiramentos apresentados na literatura do espectro FTIR de biocorante <i>Monascus purpureus</i> .....	12
<b>Tabela 2.2:</b> Relação do comprimento de onda absorvida e cor refletida .....	13
<b>Tabela 2.3:</b> Principais grupos cromóforos e auxocromos em moléculas de corantes .....	14
<b>Tabela 2.4:</b> Classificação Colour Index conforme as classes químicas.....	15
<b>Tabela 2.5:</b> Classificação Colour Index conforme a utilização por substrato.....	16
<b>Tabela 2.6:</b> Azo aminas (Arolaminas) de uso restrito em artigos de tecido e couro .....	18
<b>Tabela 2.7:</b> Corantes com potencial carcinogênico ou preocupação equivalente .....	19
<b>Tabela 2.8:</b> Principais características dos corantes usados no tingimento de couro.....	21
<b>Tabela 2.9:</b> Temperatura de retração para couros curtidos com diferentes curtentes.....	31
<b>Tabela 2.10:</b> Testes rápidos de controles da etapa de tingimento .....	39
<b>Tabela 2.11:</b> Análises de estabilidade de cor de artigos tingidos .....	40
<b>Tabela 4.1:</b> Culturas depositadas na Coleção de Micro-organismos de Interesse Agro silvicultural e repassadas para a UFRGS.....	48
<b>Tabela 4.2:</b> Componentes utilizados no mix de PCR .....	49
<b>Tabela 4.3:</b> Formulação de tingimento de bancada .....	54
<b>Tabela 4.4:</b> Formulação de tingimento em escala piloto de couro wet-blue com corante produzido por <i>Monascus purpureus</i> .....	55
<b>Tabela 4.5:</b> Avaliação do número de fungos por grama de couro tingido .....	57
<b>Tabela 4.6:</b> Propriedades químicas do pelo bovino utilizado.....	58
<b>Tabela 4.7:</b> Descrição do processo de depilação da pele com conservação de pelo .....	58
<b>Tabela 4.8:</b> Resumo dos procedimentos aplicados neste trabalho .....	60
<b>Tabela 5.1:</b> Identificação molecular realizada com o fungo LPM 1473.....	63
<b>Tabela 5.2:</b> Dados colorimétricos dos biocorantes dos fungos filamentosos.....	66
<b>Tabela 5.3:</b> Produção de biocorante extracelular por cultivo submerso de <i>Monascus purpureus</i> .....	77
<b>Tabela 5.4:</b> Produção de biocorante extracelular por cultivo submerso de <i>A. niger</i> .....	79
<b>Tabela 5.5:</b> Produção de biocorante extracelular por cultivo submerso de <i>P. herguei</i> ....	80
<b>Tabela 5.6:</b> Produção de biomassa por cultivo submerso de <i>A. niger</i> , <i>M. purpureus</i> e <i>P. herguei</i> .....	82
<b>Tabela 5.7:</b> Valores de absorvância dos banhos e absorção de biocorante pelo couro para as condições de pH de desacidulação testadas .....	83
<b>Tabela 5.8:</b> Valores de absorvância dos banhos e absorção de biocorante pelo couro com relação ao tipo de ácido usado na fixação .....	83
<b>Tabela 5.9:</b> Valores de absorvância dos banhos e absorção de biocorante pelo couro com relação ao uso de auxiliar de tingimento.....	84
<b>Tabela 5.10:</b> Testes para determinação de cor do banho de tingimento .....	86
<b>Tabela 5.11:</b> Determinações em escala de cinzas de resistência da cor do couro à luz UV, calor e migração a PVC de tingimento em escala de bancada. ....	87
<b>Tabela 5.12:</b> Determinações colorimétricas de resistência térmica e ultravioleta do couro tingido com <i>Monascus purpureus</i> em escala piloto .....	88
<b>Tabela 5.13:</b> Contagem do número de fungos por grama de couros tingidos .....	89
<b>Tabela 5.14:</b> Rendimento de biocorante e biomassa nos cultivos submersos de <i>M. purpureus</i> com os substratos testados .....	92

# Capítulo 1

## Introdução

O Brasil é o mais importante produtor de couro da América do Sul, possui o maior rebanho bovino comercial do mundo e o setor industrial do país é composto por 310 plantas curtidoras, 2.800 indústrias de componentes para couro e calçados e 120 fábricas de máquinas e equipamentos, o qual gera 40.000 empregos diretos e movimenta US\$ 3 bilhões a cada ano (CICB, 2018). A produção anual brasileira é de 352,20 toneladas de couros, que representa 13% do mercado mundial (ABQTIC, 2018). As exportações brasileiras de couros e peles é liderada pelo Rio Grande do Sul e registrou até o final de agosto de 2018 o valor de US\$ 990.387.859 e uma área de couro de 119.714.354 m<sup>2</sup>, sendo 92.972.830 m<sup>2</sup> de couro bovino distribuídos em 48,4 % de couro acabado, 42,8 % de couro *wet blue* e 8,8 % *crust* (SECEX, 2018).

A indústria do couro gera resíduos de corantes (não fixados ao couro) em efluentes e lodos sedimentados (Sivakumar *et al.*, 2009; Kanth *et al.*, 2009) que podem causar problemas à saúde e ao meio ambiente devido à sua baixa degradabilidade e alta toxicidade (Vedaraman e Muralidharan, 2011; Hilaes *et al.*, 2018). A poluição indesejável associada a corantes em efluentes, especialmente corantes azo e complexos metálicos, pode resultar em redução da capacidade de reoxigenação da água, toxicidade aguda e crônica e dificuldades no tratamento da água por métodos biológicos, além de impedir a reutilização da água em outras etapas de processo (Piccin *et al.*, 2013a,b; Piccin *et al.*, 2016; Gomes *et al.*, 2016; Rosales *et al.*, 2016).

A exigência do controle de substâncias perigosas em calçados e artigos de couro está crescendo fortemente, principalmente em países membros da União Europeia em cumprimento ao Regulamento REACH (ECHA, 2018). Existem também organizações e certificações, como

o Leather Working Group que visam desenvolver e manter um protocolo que audita o cumprimento da legislação ambiental e promove práticas ambientais sustentáveis e apropriadas para indústria do couro (LWG, 2018; CICB, 2018). Mais de 90% dos couros em todo mundo são tingidos com corantes azóicos (Page, 2001), sendo que alguns destes podem formar arilaminas com efeitos perigosos à saúde humana e são de uso restrito em artigos finais nas concentrações máximas de 20 ppm, na China, e 30 ppm, na União Europeia (AAFA, 2018).

Alguns corantes naturais são alternativas não alérgicas, não tóxicas, oriundas de fontes sustentáveis e que são muito importantes para tingimento de materiais fibrosos, como têxteis ou couro e para a coloração de alimentos (Sivakumar *et al.*, 2009). Corantes naturais conhecidos são extraídos a partir de fontes com potenciais nutricionais e farmacêuticos como frutas, folhas, sementes ou raízes, mas a produção desses corantes é secundária à produção de alimentos e remédios, dependendo da disponibilidade de matéria-prima. Corantes extraídos a partir de fungos filamentosos são alternativas promissoras de corantes naturais, porque eles não são dependentes de efeitos sazonais para sua produção e podem crescer rapidamente, o que pode conduzir a um rendimento elevado (Dufossé *et al.*, 2014; Velmurugan, 2009).

Existe uma grande diversidade de fungos filamentosos a ser explorada na produção de corantes, bem como de técnicas de aplicação, a fim de melhorar as suas propriedades (Srianta *et al.*, 2016; Lopes *et al.*, 2013a). Os fungos produzem uma ampla gama de metabólitos secundários com propriedades bioativas, como antibióticos, alcalóides, ácidos graxos, álcoois, cetonas e toxinas, durante o desenvolvimento celular, e que estão sendo usados como importantes agentes medicinais, como as penicilinas antibióticas, as equinocandinas antifúngicas, as estatinas redutoras de colesterol e as ciclosporinas imunossupressoras (Kumar *et al.*, 2018), em alimentos (Dufossé, 2018), tingimento de tecidos e couro (Fuck *et al.*, 2018a,b) e Velmurugan 2010 a,b,c), entre outros fins.

Neste trabalho, inicialmente, foi procedido um *screening* de fungos filamentosos que sintetizam corantes como metabólitos secundários, selecionando as cepas de *Aspergillus niger* IFL5, *Penicillium chrysogenum* IFL1, *Penicillium herguei*, *Penicillium vasconiae* IFL4, *Monascus purpureus* NRRL1992, *Fusarium oxysporium* e *Fusarium graminearum*, LPM 1473 e LPM 1504, e relacionando as cores produzidas com a potencial aplicação em couro. Estas cepas foram repicadas, incubadas em cultivo submerso com meio batata dextrose durante duas a cinco semanas, extraídas por filtração e concentradas em rotaevaporador a vácuo. A

caracterização da produção e dos extratos dos corantes pelos fungos foi analisada por FTIR, espectro de varredura, valores de biomassa e densidade óptica. O biocorante de *Monascus purpureus* foi aplicado no tingimento de couro e as propriedades químicas e físicas do couro tingido foram analisadas. Ainda, produziu-se um substrato para cultivo submerso de *Monascus purpureus* a partir da hidrólise ácida do resíduo de pelo bovino da indústria coureira.

## 1.1 Objetivos do trabalho

Este trabalho tem como objetivo geral pesquisar, produzir e selecionar alternativas de corantes naturais, obtidos a partir de fungos filamentosos para aplicação no tingimento de couro.

Os objetivos específicos da tese são:

- a) apresentar o estado da arte de pesquisas referentes a aplicações de corantes naturais fúngicos;
- b) apresentar uma rota de estudos para seleção de biocorantes fúngicos para tingimento de couro;
- c) realizar produção de biocorantes por cultivos submersos de fungos filamentosos e estudar aspectos técnicos e de produtividade por espectroscopia de FT-IR, UV-vis, e análise gravimétrica;
- d) aplicar procedimento de identificação genômica de fungo filamentoso;
- e) aplicar o corante de *Monascus purpureus* no tingimento de couro em escala laboratorial e piloto e analisar as propriedades de estabilidade (solidez) da cor;
- f) propor um procedimento de hidrólise do resíduo de pelo bovino gerado nas etapas de depilação, tipo *hair saving*, da indústria do couro para uso alternativo como substrato para produção de biocorante por cultivo submerso de *M. purpureus*;
- g) produzir biocorantes por cultivo submerso de *M. purpureus*, utilizando substrato de pelo hidrolisado comparativamente com meios comerciais.

## 1.2 Estrutura do trabalho

A presente tese é constituída por seis capítulos, sendo a introdução o Capítulo 1, que apresenta o tema desenvolvido, objetivos e contribuições deste trabalho.

No Capítulo 2 é feita a revisão bibliográfica referente aos conhecimentos aplicados nesta tese de doutorado, iniciando pela abordagem de fungos filamentosos, métodos de cultivo, identificação e caracterização. Na sequência são descritos os tipos, características e classificação dos corantes sintéticos de relevância para tingimento de couro e os corantes naturais, enfatizando o estado da arte sobre corantes fúngicos. Após, apresenta-se uma base teórica sobre a constituição da pele e a descrição das etapas do processamento do couro e, por fim, a etapa de tingimento de couro. Os fatores que influenciam esta etapa de tingimento, bem como os controles das características e análises físico-químicas empregados na indústria do couro também são descritos.

O Capítulo 3 é formado pelo artigo publicado “*Leather Dyeing with Biodyes from Filamentous Fungi*, *Journal of the American Leather Chemists Association*, v. 113, p. 299-310, 2018”, referente aos estudos aprofundados da literatura recente sobre a melhoria das técnicas de tingimento de couro e a busca de corantes naturais para fins industriais, enfatizando os desenvolvimentos relacionados aos corantes dos fungos filamentosos *Monascus purpureus*.

No Capítulo 4 são apresentados os materiais e os métodos aplicados na elaboração da parte experimental da presente tese.

No Capítulo 5 são apresentados e discutidos os resultados dos experimentos que compõem a presente tese, alguns destes resultados publicados no artigo intitulado “*Screening for Natural Dyes from Filamentous Fungi and Leather Dyeing with Monascus purpureus extract*, *SLTC Journal*, v. 102, p. 69-74, 2018” e em outros trabalhos submetidos a congressos científicos da área.

O Capítulo 6 apresenta as conclusões e considerações finais para continuação dos trabalhos.

## Capítulo 2

### Revisão Bibliográfica

No capítulo 2 é apresentada a revisão bibliográfica referente aos conhecimentos aplicados nesta tese de doutorado, iniciando pela abordagem de fungos filamentosos, métodos de cultivo, identificação e caracterização. Na sequência, são descritos os tipos, características e classificação dos corantes sintéticos de relevância para tingimento de couro e os corantes naturais, enfatizando o estado da arte sobre corantes fúngicos. Após será abordada uma base teórica sobre a constituição da pele e a descrição das etapas do processamento do couro e, por fim, a etapa de tingimento de couro. Os fatores que influenciam esta etapa de tingimento, bem como os controles das características e análises físico-químicas empregados na indústria do couro também são descritos.

A revisão bibliográfica sobre melhoria das técnicas de tingimento de couro e pesquisas de corantes naturais para uso industrial, enfatizando o desenvolvimento relacionado aos corantes de fungos filamentosos *Monascus purpureus* estão apresentados no Capítulo 3, referente ao artigo *Leather Dyeing with Biodyes from Filamentous Fungi* publicado na revista *Journal of American Leather Chemists Association*, v. 113, p. 299-310, 2018.

#### 2.1 Fungos filamentosos

Os fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos, aclorofilados que se reproduzem por mitose (assexual) e meiose (sexual) e armazenam glicogênio como substância reserva. Estes microrganismos variam de organismos unicelulares simples, principalmente leveduras, a espécies complexas de fungos filamentosos e cogumelos basidiocarpos) e apresentam parede



celular composta principalmente por quitina, glucano, quitosana, mananoligossacarídeos e glicoproteínas (Patterson e Sutton, 2018).

Fungos filamentosos são microrganismos morfológicamente complexos, exibindo diferentes formas estruturais em todo seu ciclo de vida. A estrutura vegetativa básica de crescimento é composta de filamento tubular conhecido como hifa que se origina a partir da germinação de um único esporo reprodutivo e o conjunto de hifas emaranhadas forma o micélio (Papagianni, 2004). A habilidade dos fungos filamentosos de crescer em substratos simples e de baixo custo, bem como sua capacidade de produzir diversos metabólitos, tem despertado o interesse biotecnológico desses microrganismos (Meyer, 2008).

O metabolismo dos fungos pode ser dividido em metabólitos primários, os quais fornecem energia e precursores químicos às células, são essenciais para o crescimento e reprodução dos organismos, e os metabólitos secundários que não aparentam ter função direta no crescimento celular (Brakhage *et al.*, 2011).

Os metabólitos primários são as pequenas moléculas produzidas ao longo do crescimento vegetativo (Abreu *et al.*, 2015), destacando o uso em indústrias alimentícias e de ração incluindo alcoóis (etanol), aminoácidos (glutamato monossódico, lisina, treonina, fenilalanina, triptofano), nucleotídeos flavorizantes (ácido 5-guanílico, ácido 5-inosínico), ácidos orgânicos (acético, propiônico, fumárico, láctico), polióis (glicerol, manitol, xilitol), polissacarídeos (xantana), açúcares (frutose, ribose) e vitaminas (riboflavina, cianocobalamina, biotina) (Rajasekaran *et al.*, 2008; McNeil, *et al.*, 2013; Jiang, *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2017).

Metabólitos secundários são usualmente separados em cinco grupos: derivados de aminoácidos, peptídeos não ribossomais, policetídeos, derivados de ácidos graxos e híbridos de policetídeos-peptídeos (Rose *et al.*, 2011). Muitos apresentam atividades antibióticas, tóxicas e imunossupressoras de grande importância para a indústria farmacêutica e são sintetizados a partir de um metabólito primário (Skellam, 2018).

As principais características dos metabólitos secundários são (Kempken e Rohlf, 2010; Nigam e Singh, 2014):

- produzidas ao final da fase exponencial de crescimento ou durante condições limitadas de substrato;
- distribuição taxonômica restrita: nem todas as linhagens de uma mesma espécie são capazes de produzir determinado metabólito;
- não essenciais para o crescimento e reprodução do organismo;
- produção controlada pelas condições de cultivo, principalmente composição do meio;
- produzidos como um grupo de estruturas intimamente relacionadas;
- podem ser produzidos em larga escala;
- podem desempenhar funções como hormônios sexuais, ionóforos, efeito tóxico ou inibidores em outros microrganismos (bactérias, fungos, amebas, insetos e plantas), agentes de simbiose; efetores de diferenciação.

A fase de crescimento dos fungos é um parâmetro fundamental na produção de metabólitos secundários. No primeiro estágio de cultivo, os fungos utilizam principalmente carbono e nitrogênio de substratos para a síntese de metabólitos primários, e então os metabólitos secundários são detectados no final do crescimento (Srianta *et al.*, 2016).

### **2.1.1 Métodos de cultivo**

Os processos usados para produção de metabólitos fúngicos são classificados como cultivo em substrato sólido e cultivo submerso, conforme a quantidade de água disponível no meio (Lopes, 2011). O primeiro método, também denominado como cultivo em meio sólido, em estado sólido ou ainda semissólido é caracterizado pela ausência total ou parcial de água livre. Os fungos filamentosos são inoculados diretamente em materiais não-solúveis e os utilizam como suportes físicos e fontes de nutrientes (carbono, nitrogênio e minerais), penetram na superfície e produzem biocorante disperso no meio (Wu *et al.*, 2004). Geralmente, para utilizar adequadamente o substrato e manter a temperatura e a umidade ideais, os procedimentos de operação da cultura em estado sólido são complexos e demorados. Além disso, alguns problemas como a restrição de transferência de oxigênio, controle de pH e contaminação dificultam a produção em grande escala (De Carvalho, 2011).

Cultivo submerso é o processo em que o microrganismo é inoculado num meio com presença de oxigênio, com excesso de água livre, contendo o substrato (nutriente) solúvel ou disperso e prontamente disponível para consumo, e permite fácil manuseio, escalonamento e controle de parâmetros de bioprocessos (pH, aeração, agitação, umidade, problemas de contaminação). Assim, o metabólito é produzido homoganeamente no extrato aquoso e pode ser separado do micélio e resíduo de substrato por filtração (Lopes, 2011). Esse método consiste em um ambiente uniforme em que o crescimento é tridimensional, geralmente resultando em uma massa de pequenos *pellets* de micélio.

Em muitos casos, a produtividade de corantes por cultivo sólido é maior do que por cultivo submerso, porém o segundo é o sistema de maior aplicação industrial para a obtenção de uma variedade de importantes metabólitos produzidos por fungos filamentosos devido à facilidade de controle dos parâmetros do processo como aeração, umidade, temperatura, pH, escalonamento e extração do corante da biomassa (Meyer, 2008; Velmurugan *et al.*, 2010c). O cultivo em estado sólido é vantajoso quando o corante a ser usado puder conter resíduos do substrato como amido, fibras e partes do próprio micélio. Caso não seja possível, a fração de corante deve ser extraída com solvente orgânico, que posteriormente deve ser evaporado. Na produção por cultivo submerso, o corante apresenta-se diluído em um grande volume de líquido, porém pode ser prontamente separado da biomassa e outros eventuais componentes insolúveis por filtração (Silveira *et al.*, 2013).

Resíduos, efluentes e subprodutos industriais podem ser utilizados como substratos, ricos em nutrientes como carboidratos, proteínas, fibras, minerais e vitaminas, para produção de biocorante por cultivo de fungos filamentosos (Panesar *et al.*, 2015). Vários estudos relatam o reaproveitamento de farinha de peixe, cascas de arroz, casca de uva, soro de queijo, proteína de soja e pena de galinha moída (Lopes *et al.*, 2013a), bagaço da cana-de-açúcar (Silveira *et al.*, 2013; Hilaes *et al.*, 2018), batata doce (Srivastav *et al.*, 2015), água do cozimento de arroz (Singh *et al.*, 2015), espiga de milho (Velmurugan *et al.*, 2011), resíduos de padaria (Haque *et al.*, 2016), diferentes cereais (Srianta *et al.*, 2016) e resíduos de processamento de laranja (Kantifedaki *et al.*, 2018).

### **2.1.2 Métodos de identificação e caracterização de fungos filamentosos e metabólitos**

A identificação molecular de fungos é usualmente baseada na caracterização fenotípica e / ou genotípica, sendo o primeiro método focado no crescimento do microrganismo em diferentes meios de cultivo em ágar, exame das características morfológicas do micélio, observações microscópicas e padrões de reação físico-química (Meijer *et al.*, 2011; Piekarczyk *et al.*, 2018). Os métodos genotípicos de identificação de fungos são geralmente baseados na *Polymerase Chain* (PCR) devido à sua especificidade e sensibilidade (Kogkaki *et al.*, 2017). Entre os marcadores moleculares utilizados para este propósito destaca-se o sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*), que separa os genes 18S e 28S do rDNA e que pode ser amplificada com *primers* específicos ancorados nessas duas regiões (Fungaro, 2000). As regiões ITS são apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie porque evoluem rapidamente e podem ser amplificadas e sequenciadas com facilidade por serem flanqueadas por segmentos conservados, que compreende entre 500 e 800 pares de bases e aparecerem em grande número de cópias no genoma. Por isso, já existem um grande número de sequências ITS de diferentes fungos disponíveis nos bancos de dados de sequências de nucleotídeos. Além da região ITS, o gene da  $\beta$ -tubulina está entre os mais proeminentes genes utilizados para a identificação de fungos, pois apresentam um alto grau de conservação em nível de aminoácidos e nucleotídeos (Lopes, 2011).

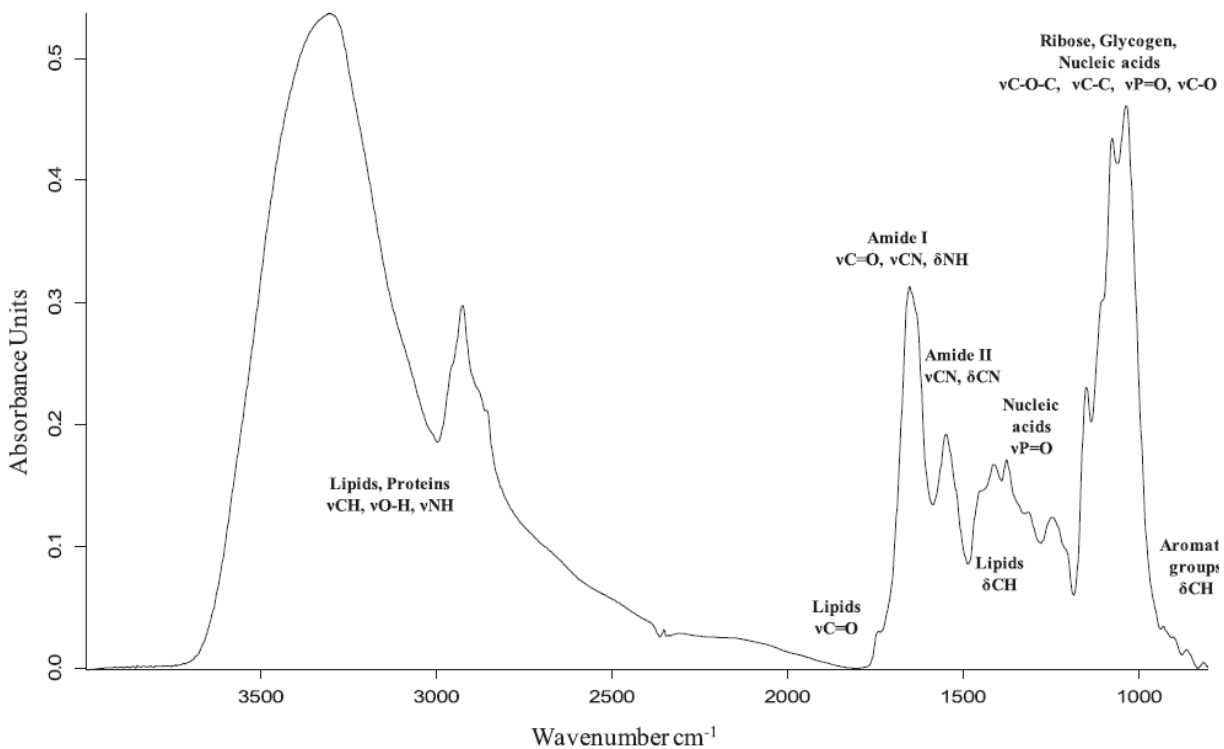
A espectrometria de massa de tempo de voo com ionização por dessorção por laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) tem sido cada vez mais utilizada para identificação de fungos filamentosos por ser um método rápido e barato para uso rotineiro (Luethy *et al.*, 2018; Luna, 2018). Em complemento, existem as usuais como métodos cromatográficos, análise por espectrofotometria UV-vis, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografia em Camada Delgada, HPLC-DAD e outros (Venkatachalam, *et al.*, 2018a; Dufossé *et al.*, 2014; Mukherjee e Singh, 2011).

Os métodos de espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) são as técnicas espectroscópicas mais utilizadas para diferenciação de espécies fúngicas (Salman *et al.*, 2010; Piekarczyk *et al.*, 2018) e seus metabólitos de forma rápida e sem a necessidade de procedimentos complexos (Santos *et al.*, 2010). O desenvolvimento de um banco de dados fúngicos bem caracterizados em espectroscopia FT-IR é uma ferramenta

importante na identificação de espécies de fungos desconhecidos usando um método menos fastidioso, de baixo custo e fácil de aplicar (Kogkaki *et al.*, 2017).

O método FTIR é usado não apenas para distinguir fungos em culturas fúngicas puras, mas também em amostras de fungos mistos com alta taxa de sucesso (Huleihel *et al.*, 2018). O perfil espectral fornece informações importantes sobre macromoléculas como proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e carboidratos presentes em células de fungos filamentosos (Lecellier *et al.*, 2014; 2015), como apresentado na Figura 2.1.

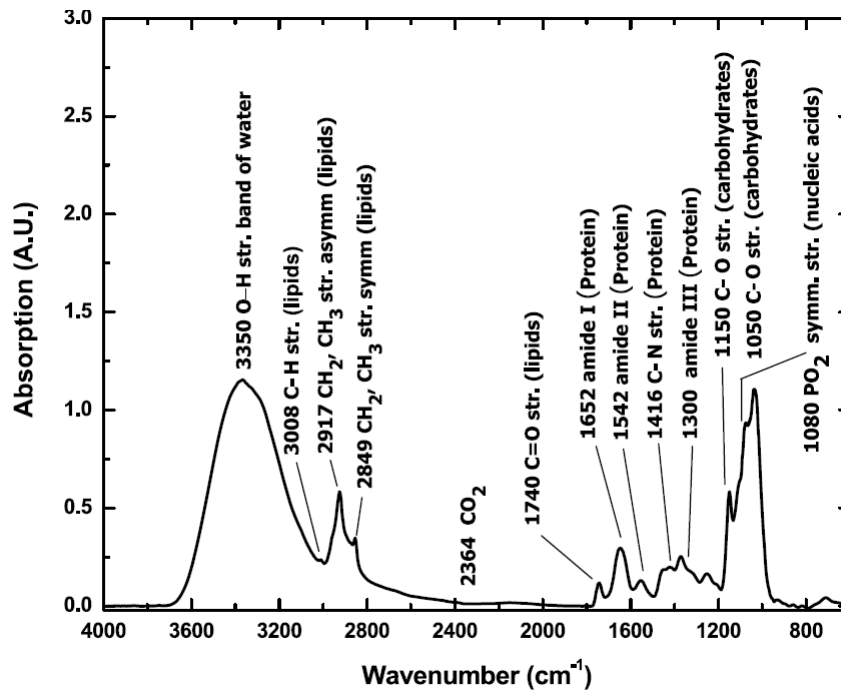
**Figura 2.1:** Espectro FTIR característico dos fungos analisados, incluindo cepas de diferentes *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp, *Penicillium* spp e outros



Fonte (Lecellier *et al.*, 2015).

O espectro infravermelho característico dos fungos filamentosos *Rhizoctonia*, *Colletotrichum*, *Verticillium* e *Fusarium oxysporium* está apresentado na Figura 2.2.

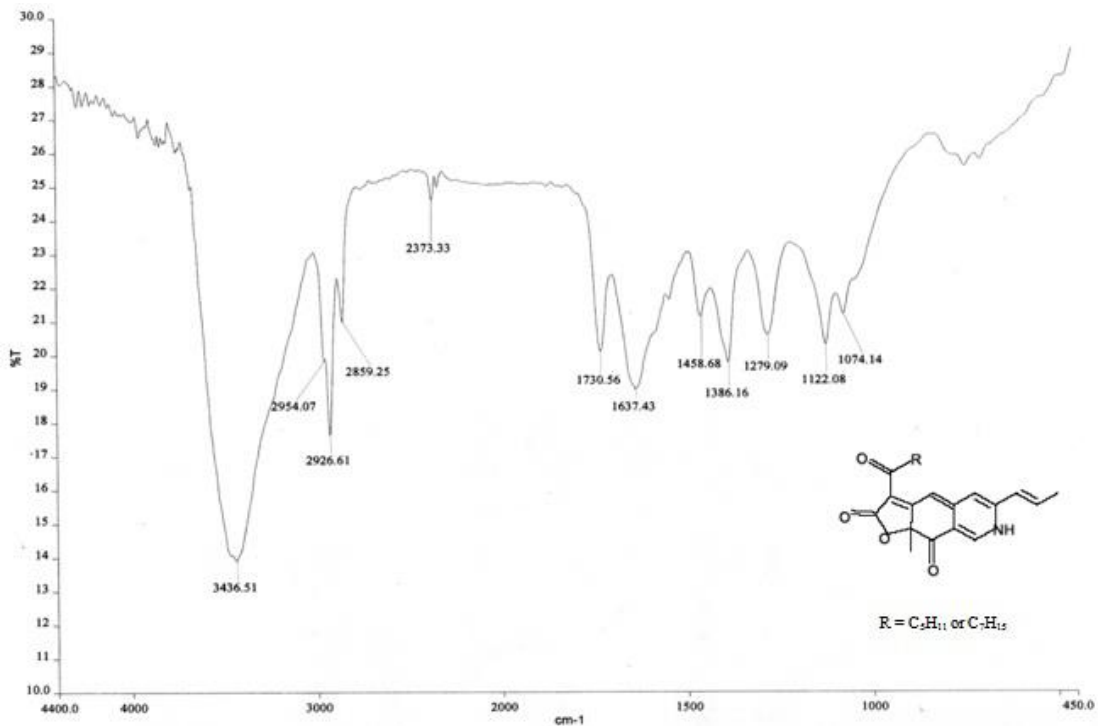
**Figura 2.2:** Espectro FTIR dos fungos *Rhizoctonia*, *Colletotrichum*, *Verticillium* e *Fusarium oxysporium*.



Fonte: Salman *et al.*, 2010.

O espectro FT-IR do biocorante de *Monascus purpureus* está apresentado na Figura 2.3.

**Figura 2.3:** Espectro de FTIR do biocorante de *Monascus purpureus*.



Fonte: Chatterjee *et al.*, 2009.

A Tabela 2.1 descreve os principais estiramentos apresentados na literatura do espectro FTIR de biocorante *Monascus purpureus*.

**Tabela 2.1:** Principais estiramentos apresentados na literatura do espectro FTIR de biocorante *Monascus purpureus*.

Estiramentos (cm <sup>-1</sup> )	Grupos funcionais
3401	-OH
3436	N-H de amida secundária
2954	C-H de grupo CH <sub>3</sub>
1730	Confirma a presença de grupo carbonila
2926, 2859 e 1456	Estiramento C-H em -CH <sub>2</sub> .
1637	C=C de sistema de ligação dupla conjugada
1458	Insaturação
2137	C=C (Alcinos)
1646	Confirma a presença de grupo carbonila (C=O)
1120 e 1079	C-O e C-C, respectivamente
726	Grupo amina (N-H)

Fonte: Mukherjee *et al.*, 2011; Chatterjee *et al.*, 2009; Srivastav *et al.*, 2015; Lian *et al.*, 2007; Hilare *et al.*, 2018.

Conforme estudos de Kogkaki *et al.* (2017), a diferenciação por FT-IR entre os fungos *Aspergillus carbonarius*, *A. niger* e *A. tubingensis* é pouco perceptível devidos aos complexos compostos formados pelas espécies de *Aspergillus spp.* Foram detectadas as ligações de estiramento C-H relacionadas com a absorção de lipídios a 3002-2801 cm<sup>-1</sup>, picos largos em 1773-1550 cm<sup>-1</sup> e absorção em 1738 cm<sup>-1</sup> atribuídos às ligações C=O. Ainda, os picos na região da impressão digital entre 1286 e 952 cm<sup>-1</sup> são de alongamento C-O-C e C = S, sendo que os primeiros picos indicam a absorção de fosfolipídios e proteínas, em particular a amida I próxima a 1650 cm<sup>-1</sup> e a amida II próxima a 1540 cm<sup>-1</sup> e os últimos picos referem-se aos carboidratos. Além disso, a banda de 1150 cm<sup>-1</sup> foi correlacionada com as ligações de estiramento de C-O de β-(1 → 4)-glucano e os picos em 1089-1091 cm<sup>-1</sup> indicam o alongamento simétrico de PO<sub>2</sub> atribuído à absorção de DNA, RNA e fosfolipídios (Kogkaki *et al.*, 2017; Tralamazza *et al.*, 2013; Socrates, 2001).

## 2.2 Corantes

Os corantes são, geralmente, moléculas orgânicas sintetizadas, de natureza aromática ou heterocíclica, solúveis em meio ácido, neutro ou básico (Christie, 2015; Heidemann, 1993) que possuem grupos funcionais eletricamente instáveis e de fácil ionização, podendo interagir com compostos de cargas opostas às suas (Gomes, 2016).

Possuem a capacidade de conferir sua cor aos substratos aos quais se fixam ou se depositam, devido à capacidade de absorção de radiação eletromagnética na região de comprimento de onda visível de 400-700 nm (cor absorvida) e de cor refletida, conforme apresentado na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2:** Relação do comprimento de onda absorvida e cor refletida.

Comprimento de onda (nm)	Cor absorvida	Cor refletida
380 – 420	Violeta	Verde – amarelo
420 – 440	Violeta – azul	Amarelo
440 – 470	Azul	Laranja
470 – 500	Azul – verde	Vermelho
500 – 520	Verde	Púrpura
520 – 550	Verde – amarelo	Violeta
550 – 580	Amarelo	Violeta – azul
580 – 620	Laranja	Azul
620 – 680	Vermelho	Azul – verde
680 – 780	Púrpura	Verde

Fonte: Shimadzu, 2012.

As moléculas de corantes são formadas pelos grupos cromóforos, responsáveis por absorver a luz visível e transmitir sua cor correspondente, e por auxocromos que possuem habilidade de deslocar bandas de absorção de cromóforos para comprimentos de onda maiores e também por aumentar sua intensidade (Dos Santos *et al.*, 2007).



Os principais grupos cromóforos e auxocromos presentes nas moléculas corantes são apresentados na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3:** Principais grupos cromóforos e auxocromos presentes em moléculas de corantes.

Grupos Cromóforos	Grupos Auxocromos
Alceno: -C=C-	-H
Alcino -C≡C-	Metila: -CH <sub>3</sub>
Carbonílico: -C=O	Hidroxila: -OH
Carboxílico	Carboxílico: -COOH
Azo: -N=N-	Amina primária: -NH <sub>2</sub>
Nitro: -NO <sub>2</sub>	Amina secundária: -NHR
Nitroso: -N=O	Amina terciária: -NR <sub>2</sub>
Nitrato	Metoxila: -OCH <sub>3</sub>
	Sulfônico: -SO <sub>3</sub> H

Fonte: Covington (2011), Christie (2015) e Shimadzu (2012).

### 2.2.1 Classificação de corantes

Os corantes podem ser classificados segundo diversos aspectos, como estrutura química, uso a que se destina (material a ser aplicado), método de aplicação, origem, entre outros (Veloso, 2012; Mella, 2017a).

O *Colour Index* (CI), publicação em conjunto entre a *American Association of Textile Chemists and Colorists* e a *British Society of Dyers and Colorists* é a lista mais utilizada para identificação dos corantes, comercializados com diferentes nomes, sendo organizada por nomes e números com a finalidade de designar os diversos tipos. De acordo com o *Colour Index*, os corantes e pigmentos podem ser classificados em 26 tipos segundo as classes químicas a que pertencem e, ou, 20 tipos, além de algumas subdivisões, conforme as aplicações a que se destinam.

A classificações conforme *Colour Index* segundo classes químicas está apresentada na tabela 2.4 (ABQUIM, 2011).

**Tabela 2.4:** Classificação *Colour Index* conforme as classes químicas.

<b>Classe</b>	<b>Classificação por aplicação</b>
Acridina	Básicos, pigmentos orgânicos
Aminocetona	À tina, mordentes
Antraquinona	Ácidos, mordentes, à tina, dispersos, azóicos, básicos, diretos, reativos, pigmentos orgânicos
Ao enxofre	Enxofre, à cuba
Azina	Ácidos, básicos, solventes, pigmentos orgânicos
Azo	Ácidos, diretos, dispersos, básicos, mordentes, reativos
Azóico	Básicos, naftóis
Bases de oxidação	Corantes especiais para tingimentos de pelo, pelegos, cabelos
Difenilmetano	Ácidos, básicos, mordentes
Estilbeno	Diretos, reativos, branqueadores ópticos
Ftalocianina	Pigmentos orgânicos, ácidos, diretos, azóicos, à cuba, reativos, solventes
Indaminae Indofenol	Básicos, solventes
Indigóide	À tina, pigmentos orgânicos
Metina e Polimetina	Básicos, dispersos
Nitro	Ácidos, dispersos, mordentes
Nitroso	Ácidos, dispersos, mordentes
Oxazina	Básicos, mordentes, pigmentos orgânicos
Quinolina	Ácidos, básicos
Tiazina	Básicos, mordentes
Tiazol	Branqueadores ópticos, básicos, diretos
Triarilmetano	Ácidos, básicos, mordentes
Xanteno	Ácidos, básicos, mordentes, branqueadores ópticos, solventes

Fonte: ABQUIM, 2011.

A classificação conforme *Colour Index* segundo as aplicações está apresentada na Tabela 2.5 (ABQUIM, 2011).

**Tabela 2.5:** Classificação *Colour Index* conforme a utilização por substrato.

<b>Classe</b>	<b>Principais campos de aplicação</b>
Branqueadores ópticos	Detergentes, fibras naturais, fibras artificiais, fibras sintéticas, óleos, plásticos, sabões, tintas e papel
Corantes	
À cuba sulfurados	Fibras naturais e fibras artificiais
À tina	Fibras naturais
Ácidos	Alimentos, couro, fibras naturais e sintéticas, lã e papel
Ao enxofre	Fibras naturais
Azóicos	Fibras naturais, Fibras sintéticas
Básicos	Couro, Fibras sintéticas, lã, madeira e papel
Diretos	Couro, fibras naturais, fibras artificiais e papel
Dispersos	Fibras artificiais e fibras sintéticas
Mordentes	Alumínio anodizado, lã, fibras naturais e fibras sintéticas
Reativos	Couro, fibras naturais, fibras artificiais e papel
Solvente	Ceras, cosméticos, gasolina, madeira, plásticos, solventes orgânicos, tintas de escrever e vernizes
Pigmentos Orgânicos	Tintas gráficas, tintas e vernizes, estamperia têxtil, plásticos
Pigmentos inorgânicos	Tintas gráficas, tintas e vernizes, estamperia têxtil, plásticos

Fonte: ABQUIM, 2011.

A seguir será apresentada uma descrição dos principais grupos de corantes sintéticos utilizados.

**Corantes reativos:** os principais contêm a função azo e antraquinona como grupos cromóforos e clorotriazinila e sulfatoetilsulfonila como grupos eletrolíticos (reativos). Estes corantes apresentam como característica a alta solubilidade em água e alta estabilidade da cor devido à formação de ligação covalente entre os grupos reativos do corante com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras proteicas (Frinhani, 2003).

**Corantes Básicos:** são corantes catiônicos formados principalmente por derivados amino (-NH<sub>2</sub>), frequentemente são da classe do triarilmetano ou xanteno e com principal aplicação em papel. São comercializados em forma de cloretos, sulfatos ou oxalatos (Frinhani, 2003).

**Corantes ácidos:** são corantes aniônicos que apresentam grupos auxocrômicos ácidos, tais como hidroxila (-OH), nitro (-NO<sub>2</sub>), sulfônico (-SO<sub>3</sub>H) e carboxila (-COOH) na molécula (Frinhani, 2003), e possuem estrutura química baseada em compostos azo, antraquinona,

triarilmetano, azina, xanteno, ketonimina, nitro e nitroso, que fornecem uma ampla faixa de coloração e grau de fixação. Estes grupos substituintes ionizáveis tornam o corante solúvel em água, e têm vital importância no método de aplicação do corante em fibras protéicas (Guaratini, 2000). Corante de antraquinona é a segunda importante classe de corantes, enquanto a classe mais importante consiste de corantes azo, que forma um pouco mais de 50% dos corantes comerciais. A vantagem de corantes de antraquinona em comparação com corantes azo é o seu brilho superior. Corantes de antraquinona possuem boas propriedades de resistência à luz, o que torna a metalização desnecessária. Esta é uma vantagem, porque metalização enfraquece as cores (Raisanen *et al.*, 2002).

**Corantes dispersos:** Constituem uma classe de corantes insolúveis em água aplicados em fibras hidrofóbicas através de suspensão (partículas entre 1 a 4 micra). Durante o processo de tingimento, o corante sofre hidrólise e a forma originalmente insolúvel é lentamente precipitada na forma dispersa sobre o substrato. Usualmente o processo de tingimento ocorre na presença de agentes dispersantes com longas cadeias que normalmente estabilizam a suspensão do corante facilitando o contato entre o corante e a fibra hidrofóbica. (Püntener, 2000). Estes compostos não são utilizados no tingimento de couro, mas podem estar presentes nos componentes que compõem os artigos.

**Corantes pré-metalizados:** são úteis principalmente para tintura de fibras proteicas e poliamida. Os corantes são caracterizados pela presença de um grupo hidroxila ou carboxila na posição orto em relação ao grupo cromóforo azo, permitindo a formação de complexos com íons metálicos. Neste tipo de tintura explora-se a capacidade de interação entre o metal e os agrupamentos funcionais portadores de pares de elétrons livres, como aqueles presentes nas fibras protéicas (Christie, 2015).

**Corantes de enxofre:** é uma classe de corantes que se caracterizam por compostos macromoleculares com pontes de polissulfetos (-Sn), os quais são altamente insolúveis em água. Em princípio são aplicados após pré-redução em banho de ditonito de sódio que lhes confere a forma solúvel e são reoxidados subsequentemente sobre a fibra pelo contato com ar. Estes compostos têm sido utilizados principalmente no tingimento de fibras celulósicas.

**Corantes diretos ou substantivos:** são formados por corantes que contenham radical amina. Formam grupos diazo e combinam com outras aminas aromáticas e fenóis para produzir

moléculas lineares, longas, com configuração coplanar. Esta classe de corantes é constituída principalmente por corantes contendo mais de um grupo azo ou pré-transformados em complexos metálicos. A grande vantagem desta classe de corantes é o alto grau de exaustão durante a aplicação e conseqüentemente diminuição da concentração de corante no efluente.

Corantes azóicos: são os corantes mais utilizados nas indústrias (Hussain *et al.*, 2017a) que possuem grupos funcionais do tipo azo (-N=N-) em diferentes proporções (monoazo, diazo, triazo, poliazo) ligados a compostos aromáticos e formam ligação covalente com o colágeno do couro, conferindo alta estabilidade e resistência a agentes oxidantes (Ortiz-Monsalve, 2015; Rodriguez-couto, 2015). Existem milhares de corantes azo, porém alguns podem ser degradados e formar aminas restritas potencialmente danosas à saúde humana e ao meio ambiente. Os corantes azo que liberam essas aminas (Arlaminas) listadas na Tabela 2.6 são regulados e não devem mais ser usados para tingir tecido e couro (ZDHC, 2018; AAFA, 2018; AFIRM, 2018).

**Tabela 2.6:** Azo aminas (Arlaminas) de uso restrito em artigos de tecido e couro.

Nome do Índice de cor	Nº CAS	Nome do Índice de cor	Nº CAS
4- Aminodifenil	92-67-1	3,3'- Dimetil-4,4'-diaminodifenilmetano	838-88-0
Benzidina	92-87-5	p-Cresidina	120-71-8
4-Cloro-o-toluidina	95-69-2	4,4'-Metileno-bis-(2- cloroanilina)	101-14-4
2- Naftilamina	91-59-8	4,4'- Oxidianilina	101-80-4
o-Aminoazotolueno	97-56-3	4,4'- Tiodianilina	139-65-1
2-Amino-4-nitrotolueno	99-55-8	o-Toluidina	95-53-4
p -Cloroanilina	106-47-8	2,4- Toluenodiamina	95-80-7
2,4-Diaminoanisol	615-05-4	2,4,5-Trimetilanilina	137-17-7
4,4'-Metilenodianilina	101-77-9	2,4-Dimetilanilina (2,4-Xilidina)	95-68-1
3,3'-Diclorobenzidina	91-94-1	2,6-Dimetilanilina (2,6-Xilidina)	87-62-7
3,3'- Dimetoxibenzidina	119-90-4	2-metoxianilina (o-Anisidina)	90-04-0
3,3'- Dimetilbenzidina	119-93-7	4-Aminoazobenzeno	60-09-3

Fonte: AFIRM, 2018; AAFA, 2018; ZDHC, 2018.

Outros corantes com potencial carcinogênico ou sob preocupação equivalente restritos ou banidos para uso na indústria do couro estão listados na Tabela 2.7.

**Tabela 2.7:** Corantes com potencial carcinogênico ou preocupação equivalente.

CAS	Nome do Índice de cor	Referência
1937-37-7	Preto Direto 38	1,2,3
2602-46-2	Azul Direto 6	1,2,3
3761-53-3	Vermelho Ácido 26	1,2,3
569-61-9	Vermelho Básico 9	1,2,3
573-58-0	Vermelho Direto 28	1,2,3
632-99-5	Violeta Básico 14	1,2,3
2475-45-8	Azul Disperso 1	1,2,3
2475-46-9	Azul Disperso 3	1,3
2580-56-5	Azul Básico 26	1,3
569-64-2	Verde Básico 4 (verde malaquita cloreto)	1,3
2437-29-8	Verde Básico 4 (verde malaquita oxalato)	1,3
10309-95-2	Verde Básico 4 (verde malaquita)	1,3
82-28-0	Laranja Disperso 11	1,2,3
2832-40-8	Amarelo Disperso 3	2,3
12222-75-2	Azul Disperso 35	2
12223-01-7	Azul Disperso 106	2,3
61951-51-7	Azul Disperso 124	2,3
730-40-5	Laranja Disperso 3	2,3
13301-61-6	Laranja Disperso 37/59/76	2,3
2872-52-8	Vermelho Disperso 1	2,3
3179-90-6	Azul Disperso 7	3
3860-63-7	Azul Disperso 26	3
56524-77-7	Azul Disperso 35A	3
56254-76-6	Azul Disperso 35B	3
12222-97-8	Azul Disperso 102	3
23355-64-8	Marrom Disperso 1	3
2581-69-3	Laranja Disperso 1	3
85136-74-9	Laranja Disperso 149	3
2872-48-2	Vermelho Disperso 11	3
3179-89-3	Vermelho Disperso 17	3
61968-47-6	Vermelho Disperso 151	3
119-15-3	Amarelo Disperso 1	3
6300-37-4	Amarelo Disperso 7	3
6373-73-5	Amarelo Disperso 9	3
6250-23-3	Amarelo Disperso 23	3
12236-29-2	Amarelo Disperso 39	3
54824-37-2	Amarelo Disperso 49	3
54077-16-6	Amarelo Disperso 56	3
548-92-9	Violeta Básico 3	3
16071-86-6	Marrom Direto 95	3
60-11-7	4 Dimetilaminoazobenzeno (Solvente Amarelo 2)	3
6786-83-0	Solvente Azul 4	3
561-41-1	4,4'-bis (dimetilamino) -4 " - (metilamino) tritil Álcool	3

Fonte: <sup>1</sup>ZDHC, 2018; <sup>2</sup>AAFA, 2018; <sup>3</sup>AFIRM, 2018.

### 2.2.2 Corantes utilizados no couro

A difusão e a reação de produtos químicos durante o processamento do couro estão relacionadas ao tamanho dos espaços disponíveis (interstícios), bem como a distância entre os elementos estruturais do colágeno, sendo que os processos químicos atuam para modificar a superfície do material (Gutterres e Mancopes, 2013).

Os corantes para couro podem ser classificados de acordo com sua estrutura química (Ribas, 2016) como azo, carbonila, ftalocianina, enxofre, etileno, nitro e nitroso (BASF, 2007; Christie, 2015). Os corantes podem também ser classificados segundo o método de aplicação em corantes ácidos, de mordente, metalizados, diretos, reativos, de cuba, dispersos e básicos (BASF, 2007; Christie, 2015). De acordo com essa classificação, os corantes mais utilizados na indústria coureira são os corantes ácidos, principalmente no tingimento de couro curtido ao cromo. Por terem caráter aniônico, têm alta afinidade com couros com carga catiônica e devem ser aplicados em meios ácidos devido à presença do grupo sulfonato (Mella, 2017a).

Embora muitos autores não façam distinção, pigmentos e corantes são agentes de coloração quimicamente diferentes e devem ser tratados como substâncias distintas no processo de fabricação do couro. Corantes possuem afinidade específica com os substratos sob os quais são aplicados, como têxtil, papel e couro, e são completamente ou parcialmente solubilizados em meio líquido (Ortiz-Monsalve, 2015). Este tipo de coloração de couro é completamente diferente da etapa de acabamento realizada na manufatura do couro *crust* (acabado), na qual são aplicados na superfície externa dos couros secos (lado da flor ou grão) corantes insolúveis e pigmentos juntamente com substâncias poliméricas aglutinantes (Heidemann, 1993; Liu *et al.*, 2008 Winter *et al.*, 2015).

Conceitualmente, os pigmentos são particulados finamente divididos, que são insolúveis em água, obtidos a partir de minerais ou a partir da síntese de compostos orgânicos ou inorgânicos. Não apresentam afinidades pelas fibras, sendo fixados sobre estes elementos através de ligações eletrostáticas, produzidas pela presença na massa de uma forte carga positiva. Apresentam maior estabilidade mediante a ação de luz, altas temperaturas e certos agentes destrutivos e, por outro lado, menor poder tintorial em relação aos corantes (Christie, 2015). 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 (Gutterres, 2011).

No processo de fabricação de couro, os corantes são aplicados na etapa de tingimento em soluções aquosas sob o couro em estado molhado, os quais são fixados tanto na superfície quanto no interior da rede de fibras curtida. Diferentemente, os pigmentos são utilizados nas operações de acabamento realizadas na fabricação de couro de acabado, juntamente com substâncias aglutinantes poliméricas na superfície do couro seco (Covington, 2011).

As principais características dos corantes usados no tingimento de couro estão apresentadas na Tabela 2.8.

**Tabela 2.8:** Principais características dos corantes usados no tingimento de couro.

<b>Tipos de corantes</b>	<b>Estrutura molecular</b>	<b>Carga</b>	<b>Grupo funcional</b>	<b>Aplicação</b>
Ácidos	Geralmente hidrofílicos e moléculas relativamente pequenas.	Aniônico	Antraquinônico, trimetilmetano, azo, nitro e nitroso	Usado para tingimento em profundidade e com alta estabilidade a luz. Apresentam afinidade por peles catiônicas e são fixados por acidificação
Básicos	Moléculas relativamente pequenas	Carga global positiva	Azo, trimetilmetano e antraquinônico	Usado para tingimento em profundidade, confere estabilidade a luz muito baixa. São fixados devido à reação eletrostática entre os grupos amino do corante e carboxílicos da pele
Diretos	Moléculas maiores em comparação aos corantes ácidos e básicos	Aniônico	Azo e ftalocianinas	Usado para tingimento superficial e conferem baixa estabilidade a luz. Fixam-se ao couro diretamente, sem necessidade de auxiliares
Metalizados	Moléculas orgânicas complexas e com alto peso molecular	Carga aniônica baixa	Azo	Usado para tingimento rápidos, com profundidade e superficial, conferindo alta estabilidade a luz. Reação entre o íon metálico e grupos carboxila.
Reativos	Alto peso molecular	Carga aniônica baixa	Antraquinônico, ftalocianina, básico e ácido	Usado para tingimento em profundidade e com alta estabilidade a luz. Formam ligação covalente com as fibras do couro

\* Corantes pertencentes a outra classe também podem ser considerados como reativos.

Fonte: adaptado de Ortiz-Monsalve, 2015.



### 2.2.3 *Corantes naturais*

Corantes naturais são alternativas importantes para substituir corantes sintéticos potencialmente prejudiciais ao homem (Sivakumar *et al.*, 2011), possuem melhor biodegradabilidade e compatibilidade no meio ambiente em relação aos corantes sintéticos (De Rossi *et al.*, 2017; Dufossé, 2017) e podem apresentar importantes propriedades bioativas, como atividades antioxidantes, antitumorais, antimicrobianas, anticarcinogênicas, entre outras (Nigam e Luke, 2016; Abreu *et al.*, 2015; Skellam, 2018).

As principais fontes para obtenção de corantes naturais são de origem vegetal (folhas, flores e frutos), animal (insetos) e microrganismos (fungos, microalgas e bactérias) e mineral (Mendonça, 2011), porém poucas apresentam capacidade de produção industrial. Corantes naturais de origem vegetal têm uma série de desvantagens que dificultam sua utilização, incluindo a dependência do fornecimento de matérias-primas e baixo rendimento de extração, agregando alto custo de produção (Kim *et al.*, 2002; Inayat *et al.*, 2010) e apresentando baixa resistência à luz e calor (Bordignon *et al.*, 2012). Existem vários estudos de técnicas aplicadas para aumentar a estabilidade da cor, como encapsulamento de corantes naturais em uma matriz de sílica através do processo sol-gel (Velho *et al.*, 2018; Fabjan *et al.*, 2012) e uso de mordentes (Shahid *et al.*, 2013).

Rossi *et al.*, 2017 ressaltam vários corantes naturais em alimentos, como beta-caroteno, extrato de cochonilha, riboflavina, extrato de urucum, páprica, açafrão, cúrcuma e tanino de acácia). A norbixina é um composto carotenóide extraído das sementes do fruto do urucum (*Bixa orellana* L.) conhecido como um corante aniônico devido aos grupos carboxílicos presentes em sua estrutura e é um material atraente para a intercalação com outros materiais via adsorção eletrostática (Fontinele *et al.*, 2018; Stringheta *et al.*, 2018). O corante Carmin de Cochonilha (*Dactylopius coccus*) é usado mundialmente como corante vermelho em alimentos, bebidas, cosméticos, fármacos, sendo, sendo seu principal componente o ácido carmínico (Bordignon *et al.*, 2012) e para a produção de 100g deste corante são necessários cerca de 14.000 insetos fêmea (Mapari, 2010).

Os corantes naturais produzidos por via biotecnológica podem apresentar diversas propriedades bioativos com efeitos terapêuticos que podem ser um diferencial importante. Mapar *et al.* (2005 e 2010) ressaltam que para solucionar a desvantagem de baixo rendimento de produção de corantes naturais é necessário explorar a potencialidade de outras fontes

biológicas, tais como microalgas, fungos e bactérias. Além disso, destacam que a seleção adequada de microrganismos, engenharia genética e tecnologia de cultivo são ferramentas disponíveis podem ser utilizadas para melhorar significativamente o rendimento da produção do corante em relação aos organismos selvagens e suprir as diversas necessidades industriais.

As microalgas estão sendo cada vez mais reconhecidas como potencial fonte produtora de carotenoides (Hu *et al.*, 2018) devido às importantes propriedades nutricionais e bioativas (Zhang *et al.*, 2014 a,b). Os fungos filamentosos são relatados como potenciais produtores de corantes para produção em larga escala e de forma controlada (Babitha *et al.*, 2008; Dufossé, 2017; Nigam e Luke, 2016). Fungos, particularmente ascomicetos, basidiomicetos (cogumelos) e líquens (associação simbiótica de fungos com um organismo fotossintetizante, geralmente algas verdes e cianobactérias) são conhecidos por sintetizar e secretar naturalmente diversas classes de corantes como metabólitos secundários. Cogumelos e líquens são difíceis de crescer sob condições laboratoriais e por isso não são adequados para produção em larga escala industrial (Maldonado e Ibarra, 2005). Corantes 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, 2010).

#### **2.2.4 Mercado de corantes naturais**

O mercado mundial de corantes naturais está estimado em mais de US\$ 2 bilhões ao ano, aumentando em 5 a 10% (De Carvalho, 2011). A comercialização bem-sucedida de compostos naturais como  $\beta$ -caroteno, luteína e astaxantina derivados de microalgas (fontes não convencionais) ou extraídos de plantas (fontes convencionais), tanto como corantes quanto suplementos nutricionais, reflete a presença e a importância do nicho (Dufossé, 2016).

O mercado de carotenóides, o grupo mais difundido de corantes naturais, está estimado em US\$ 919 milhões em 2015 (Kirti *et al.*, 2014), US\$ 1.24 bilhão em 2016 e projetado para US\$ 1.53 bilhão em 2021 (Hu *et al.*, 2018). A principal desvantagem dos corantes naturais é devido ao baixo rendimento de extração, fazendo com que seu preço atual de mercado seja aproximadamente US\$ 1 por grama, limitando assim sua aplicação apenas a peças de vestuário de alto valor agregado (Mapari *et al.*, 2005). Em alguns casos, a via de produção natural pode ser até dez vezes mais cara que a via sintética. Comparativamente, o custo do  $\beta$  caroteno produzido por microalgas é cerca de US\$ 1000,00/Kg contra US\$ 500/Kg por via sintética.

Atualmente, alguns corantes fúngicos de qualidade alimentar já estão disponíveis no mercado mundial, destacando os corantes de *Monascus*, Arpink red™ (conhecido como Natural Red™) produzidos por *Penicillium oxalicum*, riboflavina do fungo *Ashbya gossypii*, licopeno e  $\beta$ -caroteno do fungo tropical *Blakeslea trispora* (Torres *et al.*, 2016). A produção global e o consumo anual de corantes *Monascus* no Japão foram avaliados em US\$ 12 milhões e aumentaram de 100 toneladas em 1981 para 600 toneladas anual (Mostafa and Abbady, 2014).

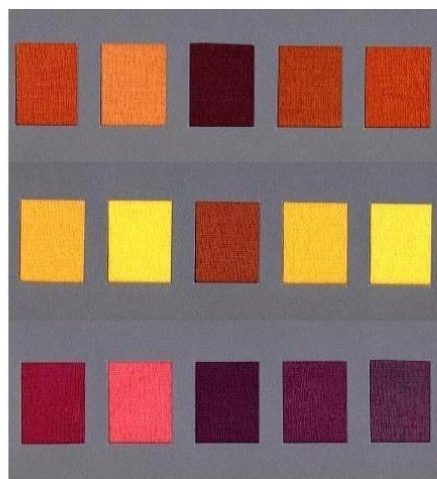
### 2.2.5 Corantes fúngicos

Os fungos filamentosos são fontes alternativas para produção de corantes naturais, pois são cultivados sob condições controladas, em qualquer local e época do ano (não depende de efeitos sazonais), não requer grandes áreas de cultivo, crescem em curto período (De Carvalho *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2017), podem reaproveitar resíduos industriais como substratos (Panesar *et al.*, 2015; Hilaes *et al.*, 2018) e produzem uma vasta gama de corantes naturais de diferentes classes químicas, como carotenóides, melaninas, azafilonas, antraquinonas, flavinas, fenazinas, quinonas, violaceína e índigo (Dufossé *et al.*, 2016). Eposito e De Azevedo (2010) destacam tonalidades, como amarelo (monascina e ancaflavina em *Monascus purpureus*), laranja (cinabarina em *Pycnoporus sanguineus*, rubropunctatina em *Monascus purpureus*,  $\beta$ -caroteno e torularodina em *Rhodotorula glutinis*), vermelho (monoasco rubramina em *Monascus purpureus*; auxarconjugatinas em *Auxarthon conjugatum*), azul (boletol em *Boletus luridus*), amarelo-alaranjado (aurofusarina e rubrofusarina em *Fusarium culmorum*). Ainda, complementam que espécies de *Drechslera* produzem hidroxiantraquinonas, tais como helmintosporina (marrom), catenarina (vermelho), cinodontina (bronze), tritisporina (vermelho-castanho).

O corante negro encontrado frequentemente em sistemas microbianos geralmente é considerado como melanina (complexo agregado de corante do tipo quinoide) ou melaproteína (Solano, 2014). O gênero *Xylaria* (Ascomycota), cujo estroma é extremamente escuro, produz também ascóporos melanizados na maturidade. As melaninas protegem os organismos contra o estresse ambiental tais como exposição a metais pesados, dissecação, condições hiperosmóticas, temperaturas extremas (*Gaeumannomyces graminis*), antagonismo com outros organismos (*Phellinus weirii*), limitação de nutrientes, choque de pH, radiação ionizante e luz ultravioleta (Henson *et al.*, 1999).

Os estudos de Raisanen *et al.* (2001 e 2002) mostram que compostos puros de antraquinona do fungo *Dermocybe sanguinea* podem produzir cores vivas e propriedades de estabilidade da cor em tecidos equivalentes à de corantes dispersos sintéticos. Conforme mostrado na Figura 2.4 pode-se obter grande variedade de tonalidades e corantes quando alterado fatores do processo como, tipos e quantidade de mordente.

**Figura 2.4:** Tonalidades conferidas pelo corante emodina em substratos de madeira



Fonte: Raisanen *et al.*, (2002).

Segundo Velmurugan *et al.* (2010b), estudos dos fatores ambientais que afetam o crescimento e metabolismo de fungos filamentosos são necessários para otimizar a produção de determinados produtos biossintéticos. Luz e temperatura são fatores ambientais fundamentais para regular os processos de desenvolvimento e fisiológicos em vários organismos, incluindo fungos filamentosos (Miyake, 2005; Babitha *et al.*, 2008; Hilares *et al.*, 2018). Ainda, a produção de corantes pode ser direcionada para um tipo específico dependendo dos substratos, das condições operacionais (temperatura, pH, oxigênio dissolvido) e do modo de cultivo em estado sólido ou submerso (Vendruscolo *et al.*, 2016a).

O gênero *Monascus* pertence ao grupo dos Ascomicetos, particularmente à família *Monascaceae*, possuindo três espécies: *M. pilosus*, *M. purpureus* e *M. ruber* (Daroit *et al.*, 2007). Os corantes obtidos do fungo *Monascus* formam um grupo de metabólitos secundários chamados azafilonas que possuem estrutura molecular e propriedades químicas similares Babitha *et al.* (2008), produzindo seis tipos diferentes de corantes, divididos em três grupos: (1) corante laranja, rubropunctatina ( $C_{21}H_{22}O_5$ ) e monascorubramina ( $C_{23}H_{26}O_5$ ); (2) corante vermelho, rubropunctamina ( $C_{21}H_{23}NO_4$ ) e monascurubramina ( $C_{23}H_{27}NO_4$ ) e (3) corante

amarelo, monascina (C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub>) e ankaflavina (C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>) que são formas reduzidas dos dois corantes laranja (Haque *et al.*, 2016).

Os produtos obtidos a partir do cultivo de *Monascus purpureus* têm sido amplamente utilizados para consumo humano há muitos séculos, principalmente em países asiáticos, como corante alimentar, conservante, suplemento alimentar, alimento funcional e medicina tradicional devido às propriedades bioativas anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana, antifúngico, antiviral, antioxidante, citotóxico, nematicida (Srianta *et al.*, 2016; Venkatachalam *et al.*, 2018b), além de redutor de colesterol, e diabetes (Feng *et al.*, 2012). Como um corante alimentar natural, os pigmentos vermelhos e amarelos têm sido amplamente utilizados nas indústrias de alimentos em carne, óleo comestível, biscoito, pão, bolos e bebidas (Srianta *et al.*, 2014).

Conforme citado por Velmurugan *et al.* (2010a), estudos anteriores indicam que *M. purpureus*, *Emericella* spp. e *Penicillium* spp. não apresentam efeitos tóxicos (Youssef *et al.*, 2008). As aplicações destes corantes fúngicos em tingimento de algodão, seda, lã e couro foram relatadas em vários estudos (De Santis *et al.*, 2005; Nagia, 2007).

Velmurugan *et al.* (2009) estudaram o efeito antibacteriano de cinco corantes fúngicos contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Dentre os estudados, os de *M. purpureus* e *P. purpurogenum* aplicados em amostras de tecido e couro apresentaram alta redução nas colônias de bactérias patogênicas. Segundo o autor, a combinação de corante microbiano e mordente (sulfato ferroso) tem boas possibilidades para a produção de vestuário e artigos de couro antimicrobianos. Os resultados indicam que o corante obtido a partir de cada fungo pode ser usado no tingimento de produtos de algodão e couro para fins farmacêuticos, hospitalares e esportivos, outros.

Velmurugan *et al.* (2010a) tiveram como objetivo em seus estudos desenvolver uma metodologia de extração de corante de filamentos fúngicos e aplicar no tingimento de couro. Foram avaliados e otimizados 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 adsorção e penetração 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 min de duração. A absorção máxima de corantes nas amostras de pele variou de 40% a 70%  $\pm$  0,2 e as variações de tonalidades das amostras foram elevadas para *M. purpureus*. Os corantes fúngicos não alteraram significativamente as propriedades organolépticas da amostra de couro.

Moritz (2005) estudou a produção de corantes vermelhos formados por *Monascus ruber* CCT 3802 em cultivo submerso utilizando substratos (resíduo agroindustrial), da fonte de nitrogênio e das condições de cultivo, 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 corantes vermelhos.

Fontes de carbono e nitrogênio constituem o principal custo do meio de cultivo e vários estudos sobre fontes alternativas relataram a produção econômica de biocorante vermelho usando vários produtos agrícolas e subprodutos. (Taskin *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2013; Silveira *et al.*, 2013; Srivastav *et al.*, 2015; Panesar *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2015; Haque *et al.*, 2016; Srianta *et al.*, 2016; Kantifedaki *et al.*, 2018; Hilares *et al.*, 2018).

*Monascus purpureus* produz diferentes cores dependendo do pH do meio, sendo predominando amarelo  $\lambda_{\max}$  a 400 nm em pH inicial baixo (2,0 - 4,0), laranja a  $\lambda_{\max}$  480 nm se mantém em estado estacionário, independentemente da condição de pH e vermelho a  $\lambda_{\max}$  500 nm em pH acima de 5,0 (6,0 - 8,0) (Chatterjee *et al.*, 2009; Srianta *et al.*, 2016).

Nos estudos de Srianta *et al.* (2016) com cultivo de *Monascus purpureus* em estado sólido, a produção de biocorantes iniciou no final da fase logarítmica, mais rapidamente utilizando arroz como substrato (4º dia), seguido por grão de sorgo descascado no (5º dia) e para outros cereais foram requeridos períodos mais longos de cultivo. A maior produção de biocorante de *Monascus purpureus*, utilizando arroz como substrato, foi de aproximadamente 250 AU/g para cor vermelha e laranja e 300 AU/g para cor amarela no 12º dia, estabilizando após esse período.

Fontes de nitrogênio como aminoácidos exercem regulação complexa sobre a expressão gênica e atividades enzimáticas para síntese de policetídeos. Os pigmentos permanecem essencialmente intracelulares devido à sua alta hidrofobicidade e excretados no meio após a reação com uma unidade NH<sub>2</sub> de aminoácidos (Hajjaj *et al.*, 2012).

## 2.3 Pele e processamento em couro

A pele é o órgão que reveste o corpo de animais superiores com funções fisiológicas, como de regular a temperatura corporal e proteger contra agentes externos, refletindo as condições geoclimáticas, tipo de alimentação, sexo, idade e estado de saúde.

A pele fresca é constituída como uma matriz reticulada de proteínas fibrosas de composição aproximada de 60-64% de água, 33% de proteínas, 2-6% de gorduras, 0,5% de substâncias minerais e 0,5% de outras substâncias (Gutterres, 2011). Devido à fluidez da água presente, as fibras das proteínas podem deslizar facilmente entre si, o que garante sua maleabilidade e elasticidade. A pele possui três camadas formadoras:

- a epiderme que é a camada superior da pele e constituída por conjunto de células queratinosas dispostas em camadas;
- a derme que é composta pelas subcamadas papilar e reticular. A camada papilar, termostática, também denominada de camada flor ou grão encontra-se junto à epiderme e é constituída por um conjunto fino e denso de fibras com presença de pelos, glândulas sebáceas e sudoríparas. Abaixo, a camada reticular é composta por um conjunto de fibras espaçadas e grossas.
- a hipoderme que é constituída por tecido adiposo, conectivo, vasos sanguíneos, nervos e músculos.

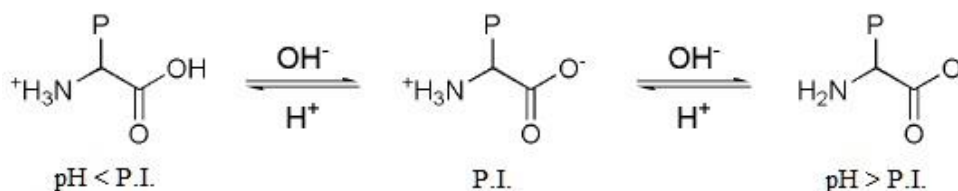
A epiderme e a hipoderme são removidas, respectivamente, nas etapas de depilação / caleiro e de descarne e a derme preservada é a parte da pele que de fato constituirá o couro. Na etapa de divisão do couro, a derme é laminada em duas camadas, a superior (mais nobre), que contém a camada flor e mais parte da camada reticular, e a camada inferior que contém apenas parte restante da camada reticular, esta que por sua vez origina o couro raspa utilizado para a produção da camurça, por exemplo.

Do total das proteínas da pele, aproximadamente 94-95% é colágeno, 1% é elastina, 1-2% é queratina e o resto são proteínas não fibrosas (Gutterres, 2011). O mecanismo de tingimento envolve a interação das moléculas do corante com o grupo funcional reativo do colágeno, complexo colágeno-curtente ou ambos e a absorção de corante pelo couro é atribuída às forças de atração específicas, tais como ligação covalente, de hidrogênio e iônica ou forças de Van de Waals (Haroun e Mansour, 2008).

A cadeia polipeptídica do colágeno é formada por 1052 resíduos de aminoácidos, de fórmula básica  $H_2N-CHR-COOH$  em forma de unidades repetidas de tripeptídeos  $(Gly-X-Y)_n$ , onde glicina (Gly) está sempre na primeira posição, X é na maioria das vezes prolina e Y é às vezes hidroxiprolina (Mancopes, 2008). Portanto, um terço dos resíduos de aminoácidos no colágeno são glicina, ou seja, 12% dos tripletos são -Gly-Pro-Hypro-, 44% são -Gly-Pro-Y- ou -Gly-X-Hypro- e 44% são -Gly-X-Y-. O conteúdo de aminoácidos determina a reatividade da proteína aos reagentes químicos usados no processo de curtimento e o ponto isoelétrico que, juntamente com o pH, controla a carga na proteína (Covington 2011).

A presença de grupos ácidos e básicos dá à proteína um caráter anfótero e, como consequência, a carga global da pele varia com o pH do meio em que se encontra. Em soluções ácidas, o grupo carboxílico encontra-se na forma não dissociada  $NH_3^+ - P - COOH$ , e a carga total é positiva. Em soluções básicas, os grupos carboxílicos estão dissociados, na forma  $NH_2 - P - COO^-$ , e suas cargas são negativas. O valor de pH em que a proteína da pele apresenta carga elétrica global nula (equilíbrio entre as cargas negativas e positivas dos grupamentos iônicos da proteína) é denominado ponto isoelétrico. O ponto isoelétrico típico de colágeno é 7,4 e o efeito do pH sobre o estado de carga de proteína está apresentado na Figura 2.5.

**Figura 2.5:** Efeito do pH sobre o estado de carga de proteína de colágeno



Fonte: Beghetto *et al.* (2013).

### 2.3.1 Etapas de produção do couro

Na fabricação do couro ocorre a modificação química e estabilização do colágeno da pele com substituição da água por determinadas substâncias, ligadas quimicamente ou fisicamente depositadas nos espaços interfibrilares (Gutterres, 2011). O processo de transformação da pele em couro compreende três fases de trabalho, denominadas operações de ribeira, curtimento e acabamento, subdivididas em várias etapas.



As operações de ribeira são realizadas para remoção da maioria das estruturas e substâncias não formadoras do couro, como a epiderme, hipoderme e material interfibrilar e ajuste de pH para a operação de curtimento. Esta fase é constituída pelas etapas de pré-descarne, remolho, depilação e caleiro, descarne e divisão, desencalagem, purga e píquel (Gutterres e Mella, 2014).

Em sequência, é realizado o curtimento em duas etapas: a difusão e a fixação do agente curtente (Aquim, 2009), sendo que o agente curtente reage com a proteína conferindo estabilidade e aumentando a resistência hidrotérmica e a putrefação da pele que a partir de curtida passa a ser denominada de couro. Os agentes curtentes empregados na indústria do couro podem ser de origem vegetal, mineral ou sintética, sendo que o mais utilizado em todo o mundo é o sal básico de cromo. O sal de cromo é normalmente sulfato básico de cromo, com basicidade de 33% e teor de óxido de cromo de 16 a 26% e é solúvel em meio ácido (Gutterres, 2011).

Os produtos orgânicos de fontes naturais mais utilizados no processamento de couro são os taninos vegetais, constituídos por misturas de polifenóis altamente complexas de massa molecular entre 500 a 3000 Da, e possuem grupos –OH em quantidades suficientes, capazes de estabelecer ligações de hidrogênio com o colágeno (Spier *et al.*, 2017). Os taninos hidrolisáveis ou pirogálicos são grandes moléculas de ésteres constituídas de um núcleo central de moléculas de açúcar ligadas através de seus grupos –OH aos grupos –COOH dos ácidos fenol-carboxílico (Venter *et al.*, 2012). São facilmente hidrolisados pela ação de ácidos e enzimas, formando produtos solúveis em água e liberando moléculas de açúcar ou álcool poli-hídrico e ácido carboxílico fenólico. Os taninos condensados ou Proantocianidinas (PACs) são poliflavonóides presentes nas plantas, constituídos por unidades monoméricas oligomerizadas / polimerizadas de flavano-3-ol (Grassel *et al.*, 2016).

Outros agentes de curtimento isentos de cromo comumente utilizados, como glutaraldeído, glutaraldeído modificado, sal fosfônio orgânico e compostos de oxazolidina, têm vários problemas, tais como odor pungente, alto teor de formaldeído livre, conferem baixa estabilidade hidrotérmica e baixa resistência à variação de cor do couro. Ainda, aumentam a eletronegatividade de couros curtidos, o que dificulta a absorção de substâncias químicas aniônicas como corantes e agentes de engraxe durante os processos de recurtimento (Li *et al.*, 2013).

Conforme Gutterres e Osório (2004), o colágeno mostra um comportamento típico sob aquecimento em água, sendo que a fibra isolada ou amostra de couro encolhe a certa temperatura de acordo com sua estabilidade hidrotérmica. A ocorrência do encolhimento (ou retração) é devido à transição da hélice tríplice do colágeno para uma estrutura enrolada aleatória, o fenômeno também é conhecido como desnaturação. A Tabela 2.9 mostra a temperatura de retração para couros curtidos com diferentes curtentes.

**Tabela 2.9:** Temperatura de retração para couros curtidos com diferentes curtentes.

Curte	Temperatura de retração (°C)
Cromo III	100 – 120
Zircônio (IV)	80 – 85
Aldeído	75 – 85
Sintanos fenólicos	70 – 85
Alumínio (III)	65 – 75
Resinas, polímeros	65 – 75
Tanino Vegetal	70 – 85

Fonte: Ritterbusch *et al.* (2014).

Após o curtimento, ocorre o enxugamento do couro curtido por meio de operação mecânica que visa eliminar o excesso de líquido para facilitar o rebaixamento. No rebaixamento, a espessura do couro é ajustada de forma homogênea e deverá prevalecer até o final do processamento.

O pH do couro no final do curtimento com cromo é geralmente próximo a 4,0, ficando abaixo do ponto isoelétrico do colágeno e, desta forma, a proteína da pele está sob a forma catiônica, muito reativa a recurtentes, corantes e agentes de engraxe aniônicos aplicados nas etapas subsequentes de acabamento molhado (Beghetto *et al.*, 2013).

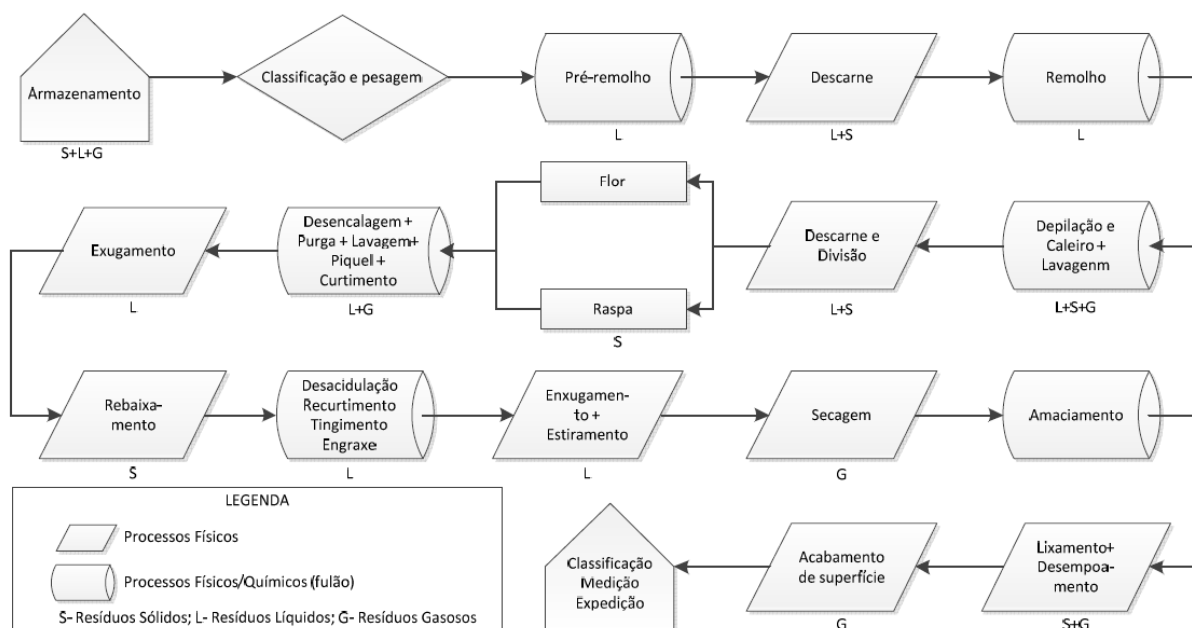
No acabamento molhado do couro, a etapa de desacidulação visa ajustar o pH do couro com sal alcalino suave a fim de aumentar o pH para valores de 5,0 a 6,5, possibilitando uma penetração regular de recurtentes, engraxantes e corantes, evitando deposição superficial destes com conseqüente tensionamento da flor (Fuck *et al.*, 2018b). A escolha dos agentes de desacidulação, bem como o pH final é realizada em função do tipo de couro a ser produzido. O ajuste de pH de desacidulação para valores mais altos garantirá uma penetração mais profunda

dos produtos químicos no acabamento molhado, enquanto um pH mais baixo provocará uma reação mais superficial (BASF, 2007).

No engraxe, o couro é tratado com matérias graxas, geralmente óleos sulfatados ou sulfonados, que reagem com a estrutura fibrosa de colágeno, mantendo as fibras separadas e lubrificadas, aumentando a resistência ao rasgamento e alongamento, e conferindo as propriedades de flexibilidade e maleabilidade ao couro que, originalmente, eram atribuídas pelo próprio teor de água presente na pele fresca (Gutterres e Mancopes, 2013).

Por fim, o acabamento final é o estágio no processo de fabricação de couro em curtumes e compreende um conjunto de etapas de tratamento com a finalidade de garantir que as propriedades de resistência apropriadas no produto final sejam obtidas. No acabamento é melhorada a aparência do couro, reduzido os defeitos e marcas da superfície, o couro adquire cobertura e brilho, sensação de tato, correspondência de cores, efeitos de cor, textura e atende vários padrões de exigência de qualidade, enquanto ainda conserva ou até mesmo restaura a aparência natural do couro. Nesta etapa são aplicados no couro muitos produtos para formar uma camada protetora de revestimento, os quais incluem resinas, tais como poliacrilatos, poliuretanos e caseína e pigmentos. (Winter *et al.*, 2015). A Figura 2.6 mostra as etapas do processamento de couro e os pontos de geração de efluente e resíduos sólidos.

**Figura 2.6:** Etapas do processamento do couro.



Fonte: Piccin, 2013.

## 2.4 Etapas de estudo do processamento do couro

A seguir serão aprofundados os conhecimentos nas operações do processamento do couro de maior relevância para este trabalho.

### 2.4.1 Depilação e Caleiro da Pele

Estas etapas têm o objetivo de retirar o pelo ou lã da pele (incluindo suas raízes e todo material queratinoso que preenche os folículos pilosos), remover a epiderme, intumescer e separar as fibras e fibrilas do colágeno, além de continuar a limpeza e desengraxe que tem início no remolho e facilitar o descarte através do inchamento da pele (Andrioli, 2012).

O sistema mais usado e conhecido utiliza a combinação sulfeto de sódio e óxido de cálcio, sendo o primeiro empregado para destruir os pelos e a epiderme e para que haja um intumescimento da pele e desdobramento das fibras. O uso de óxido de cálcio (Ca), que em água é convertido a hidróxido, tem finalidade de agir como fonte de álcali, elevando o pH do meio (Aquim, 2009). Apesar de serem excelentes agentes depilantes, os íons sulfeto também requerem certo grau de alcalinidade para reagir de maneira completa com a cistina. No caso do sulfeto de sódio, essa alcalinidade é parcialmente suprida pela dissociação alcalina desse sal em água, sendo a alcalinidade restante provida pelo hidróxido de cálcio (Gutterres, 2011). Para promover a depilação, deve-se enfraquecer e até destruir a queratina formadora do pelo e da epiderme eliminando as pontes dissulfídicas e de hidrogênio que estabilizam a proteína queratina. As pontes de hidrogênio, mais fracas que as dissulfídicas, podem ser destruídas por ação de bases de Lewis, substâncias doadoras de elétrons, como  $\text{OH}^-$ ,  $\text{H}_2\text{NR}$ , HSR ou outros. Já as pontes dissulfídicas necessitam, além da alcalinidade fornecida por grupos  $\text{OH}^-$ , também de compostos capazes de substituir o enxofre presente no aminoácido cistina, evitando assim a reestruturação das pontes (Dettmer, 2012a).

Outra técnica de depilação é baseada no processo de afrouxamento do pelo, conhecido como *hair saving*, que pode ser de natureza química, enzimática, mecânica ou químico-mecânica. O princípio de funcionamento desse processo está focado no ataque às queratinas do tipo soft (macias), que se distribuem na epiderme e membrana basal dos folículos pilosos. Dessa forma os pelos são afrouxados e removidos (e sua estrutura é mantida preservada) (Mella, 2017a). Após a depilação com conservação de pelo, o resíduo sólido é separado do efluente líquido por peneiramento, sendo passível de reaproveitado para obtenção da queratina

hidrolisada, fabricação de feltros e aglomerados (Galarza *et al.*, 2009), uso como material adsorvente e em compostos orgânicos agrícolas (Mella, 2017b). A reutilização deste resíduo contribui para reduzir o impacto ambiental negativo do setor e diminuir os custos de produção associados à destinação correta dos resíduos gerados (Andrioli *et al.*, 2015). O desenvolvimento da depilação *hair saving*, nas suas diferentes modalidades, está produzindo uma mudança nas técnicas tradicionais na indústria mundial de curtumes. A partir dessa mudança é possível obter uma redução da carga orgânica no efluente de ribeira (expressa em termos da DQO entre 40-60%), a redução da concentração de sulfetos (cerca de 50%) e também a redução dos sólidos suspensos e sedimentáveis (cerca de 75%) (Galarza *et al.*, 2009; Mella, 2017a).

Desenvolvimentos de sistemas enzimáticos de depilação *hair saving* são reportados na literatura. Dettmer *et al.* (2012 b,c, 2013) obtiveram uma enzima a partir da *Bacillus subtilis* BLBc 11 isolada de um lodo de curtume para propor um processo enzimático de depilação em substituição ao processo químico que utiliza cal e sulfetos, resultando em redução do tempo de processo em 50% e da DQO, DBO e sólidos totais em cerca de 40 a 60%. Andrioli *et al.* (2014, 2015) avaliaram o uso dessa mesma enzima em combinação com peróxido de hidrogênio para remoção de pelos bovinos, resultando na conservação do pelo, eliminação do uso de cal e sulfeto de sódio e gerando efluente com menor carga orgânica e emissão atmosférica isenta de gases tóxicos. Outras vantagens obtidas foram redução do tempo de processo de 15 a 18 horas, referente ao processo convencional, para 4 horas com o processo enzimático-oxidativo e possibilidade a reutilização do resíduo de pelos para outros fins, como a produção de fertilizantes ou a extração de queratina.

Hamiche *et al.* (2019) apresentaram duas novas queratinases purificadas, caracterizadas e designadas como KERZT-A e KERZT-B, produzidas por cepas *B. amyloliquefaciens* S13 isoladas da alga *Z. tournefortii*, as quais exibiram altos níveis de atividade e estabilidade em ampla faixa de temperatura e pH. Anzani *et al.* (2017) compararam os métodos de depilação baseados em enzimas proteolíticas (Alcalase, isolada de *Bacillus licheniformis*) e em meio oxidativo pelo uso dos agentes químicos hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio). Os resultados indicaram que ambos os métodos têm o potencial de serem alternativas mais sustentáveis aos atuais, sendo que o método oxidativo parece ser a metodologia de remoção de pelos mais eficiente e menos dispendiosa, e não requer etapas adicionais após o término do tratamento, como no caso do processo enzimático. Por outro lado, os efluentes gerados após os tratamentos enzimáticos apresentaram proteínas de boa qualidade e poderiam ser

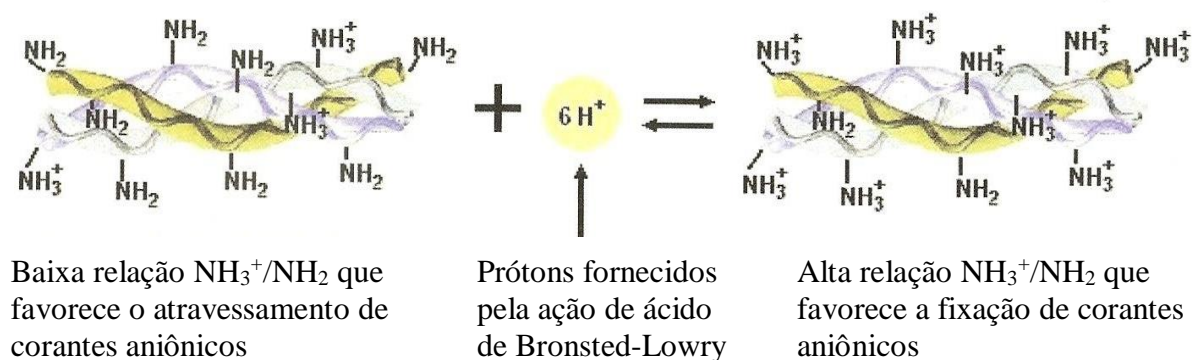
reaproveitados em formulações de rações / alimentos, enquanto os efluentes gerados nos tratamentos oxidativos possuem potencial de aplicações de menor valor devido ao dano oxidativo. Morera *et al.* (2016) propuseram mudanças no processo de depilação a fim de diminuir a poluição gerada nos efluentes, substituindo o processo redutor de degradação do pelo por um processo redutivo-oxidativo usando o peróxido de hidrogênio para reduzir o suprimento de sulfeto. Como resultado, obtém-se couro comercialmente aceitável em termos de custos e qualidade e observam-se reduções significativas na carga contaminante das águas residuais que são descartadas. Os resultados indicam que a condutividade da água residual é reduzida em 26%, os sólidos suspensos diminuem em 75%, o sulfeto observado desaparece e a aumenta a quantidade de cromo absorvida pelas peles.

#### **2.4.2 Tingimento de couro**

Tingimento é a etapa do processamento do couro realizada durante as operações de acabamento molhado com a finalidade de atribuir a cor desejada ao artigo mediante a adição de corantes solúveis em meio ácido, neutro ou básico, que possuem estrutura molecular eletronicamente instável (Covington, 2011).

As propriedades sensoriais como pureza da tonalidade, intensidade da cor e uniformidade no couro tingido são importantes e, muitas vezes, determinantes para a aceitação do artigo final. Para tanto, devem ser consideradas as condições e controles que influenciam esta etapa, assim como as características físicas e químicas dos corantes quanto à sua afinidade com o colágeno, poder de penetração e grau de fixação no couro e sua estabilidade sob ação de fatores, como luz e calor, e resistência à fricção (Ritterbusch *et al.*, 2014).

No tingimento, devem ser favorecidas as condições de difusão e fixação do corante na estrutura do colágeno. Inicialmente, a reatividade do substrato frente ao corante deve ser minimizada através do aumento do pH, a fim de possibilitar uma boa penetração do corante através de toda a espessura (interior) do couro. Após atravessamento satisfatório do corante, é realizada a acidificação do banho de tingimento, tipicamente com ácido fórmico, para promover a ionização de grupos amino do colágeno que reagirão com os grupos funcionais do corante (Beghetto *et al.*, 2013), conforme a Figura 2.7.

**Figura 2.7:** Reação de fixação de corante aniônico com a pele

Fonte: Mogiana (2007).

No processo de tingimento, atuam afinidades ou repulsões das cargas tanto do couro quanto do corante. A reatividade entre eles será maior ou menor dependendo da diferença de cargas elétricas entre couro e o corante. São pressupostos quatro tipos de ligações (Cueronet, 2014):

- interações eletrostáticas ou pontes salinas entre os grupos amino livres da proteína e os grupos sulfônico dos corantes;
- ligações de Hidrogênio entre os hidrogênios ativos do corante e os centros de alta densidade eletrônica da proteína ou entre os hidrogênios ativos do couro e grupamentos azo do corante;
- forças de Van der Waals entre corantes e proteína;
- ligações covalentes entre corante e complexo de cromo.

Usualmente, na industrialização do couro é realizada uma segunda adição de corante após a acidulação do banho de tingimento, denominado remonte. Nesta condição de pH e, geralmente, com o aumento de temperatura do banho, o corante aplicado no remonte reage apenas na superfície do couro, conferindo tonalidade mais intensa ao artigo sem interferir no corante fixado anteriormente (Bordignon *et al.*, 2012; Clariant, 2014).

Em sua grande maioria os couros são tingidos com corantes artificiais, os quais atribuem as propriedades estéticas determinantes aos artigos, porém podem ocasionar reações alérgicas, ter efeitos tóxicos, de mutagenicidade e potencial carcinogênico ao homem, quando em contato com a pele, e ao meio ambiente, quando descartadas irregularmente nos efluentes ou lodos de tratamento. O desenvolvimento de corantes ecologicamente corretos para tingimento é de

relevância tecnológica visando à produção mais limpa na indústria e à segurança para aplicação em produtos de uso em contato direto com o corpo.

#### 2.4.2.1 Fatores que influenciam o tingimento

O tingimento deve ser considerado segundo os aspectos cinéticos, que levam em conta a taxa de adsorção de corantes, e termodinâmicos, que analisam a distribuição de corante entre o couro e banho quando o equilíbrio é estabelecido. Não é simplesmente o tingimento do colágeno, e sim, tingimento do colágeno curtido e interações com todas as operações e agentes químicos utilizados até o produto final (Haroun e Mansour, 2008). 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 colágeno de uma forma particular são muitas. Ainda, a grande maioria dos insumos empregados no processamento do couro é constituída de moléculas aniônicas, o que significa grande competição pelos sítios catiônicos do colágeno. Os corantes podem interagir com grupos livres do colágeno ou complexos de colágeno e agentes curtentes ou ambos ao mesmo tempo e podem ser ligados por ligação iônica, covalente e ligações de hidrogênio, bem como por forças de *Van der Waals* (Beleska *et al.*, 2013). Os principais fatores que influenciam no tingimento são temperatura, volume do banho, dimensões do fulão, tipo de corante, tipos de curtimento e recurtimento (Hussain *et al.*, 2017a; Mela, 2017).

Em geral, os corantes possuem baixa afinidade com o couro em temperaturas ambientes, penetrando profundamente nas fibras do interior do couro sem se fixar na superfície do material. Como consequência, é obtida melhor homogeneidade da cor, porém a tonalidade superficial é menos intensa. Altas temperaturas de tingimento aumentam a afinidade do couro pelo corante, promovendo maior fixação dos corantes, mas podendo prejudicar a homogeneização de cor no artigo (Heidemann, 1993). Assim, o tingimento é usualmente procedido inicialmente em baixa temperatura (30°C) para promover maior penetração e melhor uniformidade de cor e, posteriormente, aquecido a temperatura acima de 50°C para promover a maior fixação, melhor esgotamento do banho e maior intensidade de cor (Zaliauskiene *et al.*, 2006; Basf, 2007).

Em relação à acidez do banho, o fator prioritário na desacidulação do couro é que seja feita em toda a espessura do couro e de forma homogênea. Couros que não ficam homogêneos na desacidulação, tanto nas camadas quanto nas regiões do couro, não ficarão homogêneos nos aspectos do recurtimento, tingimento e engraxe. 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 deposição superficial do corante no couro. Elevando o pH na fase inicial, seguido pela redução do pH no final, pode ajudar a distribuição homogênea do corante, sem afetar a flor ou grão. A acidificação do banho de tingimento no final do processo 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 no couro e maior será a intensidade na superfície (Beghetto *et al.*, 2013).

A uniformidade do tingimento é essencialmente determinada em todo tipo de couro, pela velocidade com a qual os corantes se ligam com as fibras do couro. 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 (Covington, 2011). Normalmente o tempo de tingimento varia entre 30 a 40 minutos.

Para obter-se um atravessamento melhor e mais rápido do corante deve-se trabalhar com volume de banho menor possível, pois isto aumentará a ação mecânica e otimizará a difusão. Já com um volume de banho maior é obtido um melhor efeito superficial e uma maior uniformidade. Maior diluição, isto é, banho mais longo, tem como efeito velocidade de montagem menor e maior uniformidade (BASF, 2007). Quanto maior for o trabalho mecânico, melhor será o atravessamento do corante em função do efeito de bombeamento do banho para o interior do couro. Haroun (2005) ressalta a técnica de tingimento compacto, em que os corantes, recurtentes e agentes de engraxe são adicionados em uma única etapa no fulão, requerendo menor quantidade de insumos em comparação aos processos tradicional, tornando o processo mais econômico e gerando menos efluente.

A natureza do curtimento determina o tipo de corante a ser usado no tingimento de couro. Corantes ácidos, por exemplo, reagem com couros curtidos ao cromo e vegetal, mas corantes básicos reagem com couros vegetais (Vedaraman e Muralidharan, 2011). 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 recurtentes 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).

Auxiliares de tingimento são agentes dispersantes e de atravessamento de corante no couro e a utilização destes insumos químicos têm o objetivo de melhorar a aplicação dos corantes e características específicas no couro tingido, tais como intensidade e homogeneidade da cor no couro. Estes produtos podem ser diferenciados de acordo com a afinidade pelo couro ou pelo corante, basicamente classificados em: auxiliares aniônicos, auxiliares que formam complexo com corante, auxiliares que possuem afinidade com couro e corante, agentes intensificadores, taninos catiônicos e auxiliares catiônicos.

#### 2.4.2.2 Controle das características exigidas aos couros tingidos

Na etapa de tingimento do couro, inúmeros testes de controle e análises quantitativas são realizados para padronizar e agregar diferentes características ao produto. Os testes para controles efetuados na etapa de tingimento estão descritos na Tabela 2.10.

**Tabela 2.10:** Testes rápidos de controles da etapa de tingimento.

Testes de controle	Observações
pH do banho	Fundamental para garantir a condição ideal para difusão e posterior fixação dos corantes às fibras de colágeno do couro.
Atravessamento	Retirar uma amostra em processo para verificar a penetração do corante na área transversal do couro. Se não for satisfatório, o processo de tingimento deve continuar.
Cor e tonalidade	Durante o tingimento, pode-se secar um pedaço antecipadamente para conferir a cor.
Equalização de tonalidade	Ao final da etapa de tingimento, o couro é seco e deve apresentar tingimento uniforme em toda a 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 alternativamente pode ser quantificada diretamente pela cor remanescente no banho por leituras em espectrofotômetro UV-Vis.

Após a etapa de tingimento, é de grande importância a realização de testes físico-mecânicos para verificar se a amostra tingida está nos padrões exigidos para os variados tipos de artigos de couro, conforme a Tabela 2.11.

**Tabela 2.11:** Análises de estabilidade de cor em artigos tingidos.

Análises	Observações
Solidez à luz e calor <ul style="list-style-type: none"> <li>• Luz Solar</li> <li>• Luz Artificial (UV)</li> <li>• Envelhecimento acelerado</li> </ul>	A degradação da cor do couro pela ação da luz e calor é um processo complexo, que depende do tipo de corante (grupo cromóforo) e do conjunto de produtos químicos utilizados no seu processo de produção (recrurtes, engraxantes e outros).
Solidez em meio aquoso <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lavagem</li> <li>• Suor</li> </ul>	Depende das propriedades moleculares dos componentes do corante. Consiste na transferência do corante não fixado no couro através de um meio líquido para outro substrato.
Solidez à migração em meio solvente <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lavagem a seco</li> <li>• Migração ao PVC</li> <li>• Fricção</li> </ul>	Transferência (migração) do corante para um substrato através de um solvente não aquoso.

Quando o couro é exposto à luz solar ou a temperaturas elevadas, absorve a energia que induz a reações fotoquímicas por mecanismos radicalares. Primeiramente, os compostos químicos sofrem cisão e os radicais livres são formados e, após, reagem imediatamente com o oxigênio formando radicais peróxido. Posteriormente, os radicais peróxidos reagem com os componentes orgânicos do couro natural, corantes, agentes de curtimento e óleos, quebrando algumas das ligações entre os referidos produtos e colágeno (Bacardit *et al.*, 2012).

A estabilidade do núcleo colorido determina a estabilidade do corante à luz, ao calor, aos agentes oxidantes ou redutores. As radiações ultravioleta e gama induzem a geração de radicais livres nos compostos orgânicos, predominantemente nas ligações  $\pi$ , um ponto fraco da estrutura da molécula. Após a excitação da molécula, por qualquer fonte de energia, as ligações  $\pi$  absorvem essa energia que, ao atingir um determinado valor, rompem a ligação. Com o rompimento, formam-se compostos de degradação que podem ou não ser coloridos. Assim, há um desbotamento da cor ou até seu completo desaparecimento (Frinhani, 2003).

O teste de estabilidade da cor a altas temperaturas em couros semiacabados ou acabados é usualmente efetuado através do envelhecimento acelerado em estufa de circulação de ar que constitui em expor o material sob temperatura e tempo determinados com o objetivo de

determinar a mudança de cor e a variação dimensional. O resultado do grau de esmaecimento da cor é expresso em escala de cinzas de 1 a 5, respectivamente o menor e maior valor.

Ensaio de solidez à luz consistem em determinar a estabilidade da cor do couro à ação de luz natural, ultravioleta ou lâmpada artificial de arco de xênon. Para estes ensaios, o Comitê Europeu de fabricantes de tintas estabeleceu como padrão de referência de cor a escala de Azul de 1 a 8, sendo, respectivamente o menor e maior valor.

A determinação de migração da cor do couro tingido consiste em colocar a amostra colorida em contato com outro substrato, podendo haver um líquido entre eles. Para o caso do teste de solidez ao suor, o corante mal fixado no couro é transferido através da solução artificial de suor até o substrato têxtil onde poderá se fixar. Outros exemplos de testes são migração ao PVC plastificado ou solventes de acabamento (por exemplo, N-metilpirrolidona). Também é usual a determinação do grau de transferência de cor de um substrato para outra superfície por fricção úmida e / ou seca, simulando a ação do dedo humano e antebraço.

A solidez a luz está diretamente relacionada com o tipo de corante (grupo cromóforo); assim, por exemplo, os corantes antraquinônicos são melhores que os azóicos, e os corantes azóicos metalizados são melhores que os não metalizados (Ritterbusch *et al.*, 2014). Segundo Liu *et al.* (2010), a adição de tocoferol, no acabamento final, melhora a resistência do couro a luz e ao calor.

#### **2.4.2.3 Estudos de tingimento de couro**

Vários estudos visam melhorar a etapa de tingimento de couro, incluindo novas técnicas, otimização de processos e uso de auxiliares de tingimento, mordentes e corantes ecologicamente corretos.

As mudanças na estrutura dérmica ocasionadas no processo de ribeira influenciam na adsorção de corantes e intensidade da cor na etapa de tingimento. Quanto maior é a concentração de insumos usados no caleiro e / ou maior o tempo de processo, maior é a abertura das fibras e, conseqüentemente, maior a adsorção de corantes e menor a intensidade de cor no couro (Beleska *et al.*, 2013). Os estudos de Zaliauskiene *et al.* (2006) revelam que couros com caleiro livre de cal absorveram menor quantidade de corante 1:2 complexo metálico no

tingimento, porém o corante penetrou mais profundamente em comparação ao processo convencional.

A aplicação de ultrassom no processamento de couro aumenta a absorção de cromo e reduz o encolhimento no curtimento (Mengistie *et al.*, 2016) e também melhora a taxa de exaustão no tingimento devido ao aumento da difusão aparente (Sivakumar *et al.*, 2008; Sivakumar *et al.*, 2009). Marsal *et al.*, (2018) demonstraram que o tingimento de couro com corantes que contenham na sua estrutura grupos amino passíveis de reação pode contribuir para a redução do teor de formaldeído livre provenientes, principalmente, do curtimento e recurtimento. O tingimento em dois estágios, no qual o couro é tingido em um fulão e, posteriormente, fixado e engraxado em outro com reutilização de 20% do banho de corante residual, promoveu a redução de 77 a 81% de efluente e manteve a intensidade de cor requerida, em comparação ao processo convencional (Vedaraman e Muralidharan, 2011).

O tratamento prévio com protease ácida no tingimento resultou em aumento da absorção e difusão do corante no couro (Kanth *et al.*, 2009). A aplicação de 10% de copolímero desenvolvido a partir de amido e álcool polivinílico proporcionou 96% esgotamento de corante do banho e reduziu a demanda bioquímica de oxigênio e demanda química de oxigênio a 66,7 e 53,0%, respectivamente (Kanagaraj *et al.*, 2016). A utilização de 2% do polímero de nanopartículas preparado a partir de aminoácidos de queratina hidrolisada resultou na absorção de corante no couro de 99% (Kanagaraj e Panda, 2011). Paul *et al.* (2012) investigaram o efeito do colágeno hidrolisado no tingimento de couro usando corantes diretos e aniônicos em diferentes condições de pH. Dependendo do pH, o colágeno hidrolisado pode melhorar ou reduzir a afinidade do corante pelo couro. Estes autores ressaltam também a possibilidade de utilizar colágeno hidrolisado no tingimento ao invés de sais.

Mordentes podem ser aplicados antes, durante e/ou após o tingimento com finalidade de obter diferentes tonalidades (Lee *et al.*, 2012) e aumentar a afinidade entre o corante e a fibra (Zhao *et al.*, 2014). Os mordentes mais conhecidos no tingimento com corantes naturais são sulfato de potássio e alumínio, dicromato de potássio, cloreto estanhoso, sulfato ferroso e sulfato de cobre (Shahid *et al.*, 2013; Samanta e Agarwal, 2009). Onem *et al.* (2011) estudaram o tingimento de couros, curtidos ao cromo e tanino vegetal tara, com de extrato de *Rubia tinctorum*, utilizando alúmen de potássio, sulfato de cobre e sulfato de ferro como pré-mordentes e pós-mordentes. Os resultados de solidez a luz, perspiração e fricção a seco e úmido

dos couros curtidos ao cromo ficaram entre 4 a 5 e nos couros curtidos com tara entre 3 a 3/4 de acordo com a escala de cinzas, sendo o maior valor obtido com a utilização do mordente alumínio de potássio após o tingimento. No trabalho de Lee *et al.* (2012), o mordente de alumínio não forma complexo com corantes naturais pretos (*gallnut* e *sappan wood*), enquanto que mordentes de ferro utilizados na quantidade de 1% sob a massa de couro produzem resultados superiores para corantes pretos. O ácido oxálico utilizado no tingimento de couro com os extratos aquosos da planta (*Camellia Sinensis*), cúrcuma (*Curcuma sp*), casca de eucalipto e noqueira (gênero *Juglans*) pelo método pós-mordente apresentou influências positivas nas propriedades do couro, incluindo estabilidade da cor ao suor e fricção (Inayat *et al.*, 2010).

Os tocoferóis mistos são produzidos a partir de fontes renováveis (Liu *et al.*, 2008) e comumente usados como antioxidantes nas indústrias de cosméticos e alimentos devido às características de sequestradores de radicais livres e agentes protetores para fibras de colágeno contra danos por radiação UV e por calor (Liu *et al.*, 2010). Segundo Bordignon *et al.* (2012), durante o tingimento de couro, o uso de tocoferol na primeira adição do corante urucum (*Bixa orellana L.*) proporcionou cor mais intensa no couro *wet-white*, mas o inverso ocorreu para o corante carmin de cochonilha (*Dactylopius coccus*). No tingimento de couro com extrato de sementes de *Bixa orellana* foi determinado o esgotamento do corante no banho de  $(81 \pm 1) \%$  e o couro apresentou solidez à fricção (seco e úmido) grau 4/5 e solidez à luz grau 3 de acordo com a escala de cinza (Selvi *et al.*, 2013). A melhor condição de tingimento de couro com uma proteína verde fluorescente foi a concentração de proteína 5 mM durante 4 h e a eficiência de ligação às proteínas foi estimada em torno de 85 e 96% (Priya *et al.*, 2016).

Bao *et al* (2017 a,b) sintetizaram uma série de surfactantes gemini catiônicos ecologicamente corretos a base de silício com grupo de ligação poliéster siloxano e grupo hidrofílico de amônio quaternário ( $C_m$ -PSi- $C_m$ ), com diferentes comprimentos de cadeia hidrofóbica ( $m = 8, 12, 18$ ) e Bao *et al* (2019) estudaram a aplicação destes nos processos de remolho e tingimento de pele de carneiro. Os resultados mostram que  $C_{12}$ -PSi- $C_{12}$  possui excelentes propriedades antifúngicas, de dispersão de fibras e de absorção e fixação do corante na pele de carneiro e, com a combinação das suas funções, pode substituir os insumos tradicionais surfactante, fungicida e agente fixador de corantes, fornecendo uma alternativa sustentável para a indústria do couro.

Khan *et al.* (2019) desenvolveram novos corantes formazanos não-metalizados e com formação de complexos metálicos para aplicação em tingimento de couro e observaram bom a alto grau de estabilidade de cor, absorção e fixação de corante no couro superior à 90% e ação antifúngica na amostra tingida. Os corantes formazanos (-N=N-C=N-NH-) são compostos por grupo azo em sua molécula, porém possuem diferenças estruturais em relação aos corantes azóicos, sendo considerados como classes separadas, e podem formar complexos metálicos no processo de metalização com sais de diferentes metais, conferindo cores intensas e ampla gama de tonalidades (Khan *et al.*, 2018; Hussain *et al.*, 2017b).

## Capítulo 3

# Special Review Paper: Leather Dyeing with Biodyes from Filamentous Fungi

by

Wagner Fernando Fuck,<sup>a\*</sup> Adriano Brandelli<sup>b</sup> and Mariliz Gutterres<sup>a</sup>  
*Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.*

<sup>a</sup>*Chemical Engineering Department, Laboratory of Leather and Environmental Studies (LACOURO)  
Eng. Luiz Englert St., P. 12204, CEP 90040-040 Porto Alegre – RS, Brazil.*

<sup>b</sup>*Food Science and Technology Institute, Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology  
Bento Gonçalves Av., 9500, P. 43212, CEP 91501-970 Porto Alegre - RS, Brazil*

Artigo publicado no periódico “*Journal of American Leather Chemists Association*, v. 113, p. 299-310, 2018”.

### ***Abstract***

Certain species of filamentous fungi typically produce colored substances as secondary metabolites, which can be used as dyes for industrial applications, especially for products intended to be used in direct contact with the human body such as leather goods. These natural biodyes can be an eco-friendly alternative to synthetic dyes (mainly azo dyes), since they are not originated from extractive activities of the environment and no hazardous chemicals are used while they are produced. Therefore, this biotechnological development for leather dyeing represents an important area to be explored and improved. However, this is a complex challenge due to the requirements of large-scale production with low cost and quality standardization with high stability and fastness. The aim of this study is to present a review on recent literature about improvements of leather dyeing techniques and the search of natural dyes for industrial uses emphasizing the developments related to dyes from filamentous fungi *Monascus purpureus*.

**Keywords:** leather dyeing; filamentous fungi, *Monascus purpureus*, biodyes.





## Capítulo 4

### Materiais e Métodos

Neste capítulo são apresentados os materiais e os métodos aplicados na elaboração da parte experimental da presente tese, cujos resultados serão apresentados no capítulo 5. A metodologia aplicada na presente tese está dividida em três etapas: a seleção de fungos filamentosos produtores de corantes naturais com potencial aplicação; o tingimento de couro em escala de bancada e piloto com o extrato colorido de *Monascus purpureus*, seguido pelos testes de controle e qualidade exigidos ao produto tingido; e, por fim, o teste de um novo substrato para cultivo submerso microbiológico a partir de resíduo da própria indústria coureira.

#### 4.1 Fungos filamentosos

Foi realizada a seleção de fungos filamentosos produtores de biocorantes como metabólitos secundários para aplicação no tingimento de couro e demais experimentos da presente tese.

##### 4.1.1 Fungos filamentosos selecionados

Em parceria com o Instituto Nacional de Proteção da Amazônia foram obtidas as cepas de fungos filamentosos LPM 1473 e LPM 1504, através do Termo de Transferência de Material referente à remessa de amostra de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial econômico N° 004/2011/INPA e descritas conforme Tabela 4.1.

**Tabela 4.1:** Culturas depositadas na Coleção de Micro-organismos de Interesse Agro silvicultural e repassadas para a Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Número de registro	Descrição	Gênero
1473 e 1504	Cultura fúngica. Fungo isolado de tronco de árvore caída. Apresentam características culturais rosada, rasa, como as bordas claras, sem produção de esporos, hifas hialinas septadas. Alteração na cor do meio de cultura para vermelho rubim, indicando ser um fungo com produção de biocorante	Não identificado

Os fungos filamentosos também utilizados nesta pesquisa, *Aspergillus niger* IFL5 (GenBank JQ614059.1), *Penicillium chrysogenum* IFL1 (GenBank JQ614063.1 e JQ614055.1), *Penicillium herguei*, *Penicillium vasconiae* IFL4 (GenBank JQ614058.1) e *Monascus purpureus* NRRL1992 (GenBank JQ614061.1 e JQ614057.1), *Fusarium oxysporium* e *Fusarium graminearum* pertencem à coleção micológica do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (UFRGS). Os fungos foram mantidos em placas de Batata Dextrose Ágar (BDA) da marca Oxoid e subcultivados periodicamente.

#### 4.1.2 Identificação molecular do fungo LPM 1473

A identificação molecular do fungo LPM 1473 foi realizada segundo o procedimento de Lopes (2011) no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (UFRGS), que está descrito a seguir, e comparativamente na empresa Genomic Engenharia Molecular Ltda .

##### 4.1.2.1 Extração do DNA genômico

O fungo filamentoso LPM 1473 foi cultivado em tubos com caldo Batata da marca Acumedia por 14 dias a 33 °C e, posteriormente, a cultura foi homogeneizada em vórtex e o micélio transferido para um microtubo do tipo eppendorf. Sob o micélio foi adicionado 500 µL de tampão de extração (200 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl ajustado a pH 7,5, 1% Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), 2% Triton X-100, 1mM EDTA) e 200 µL de pérolas de vidro (200µm). A mistura foi agitada em vórtex por ciclos de 2 minutos alternando com 30 segundos em banho de gelo. Após foi adicionado 500 µL de clorofórmio, seguido por agitação em vórtex por 30 segundos e centrifugação por 15 minutos a 13.000 rpm. A fase aquosa foi retirada e transferida para outro microtubo e efetuada nova lavagem adicionando 100 %, em relação ao volume de

amostra, de clorofórmio com sucessiva agitação em vórtex por 30 segundos e centrifugação por 15 minutos a 13.000 rpm. Novamente, a fase aquosa foi transferida para outro microtubo ao qual foram adicionados 200 %de etanol absoluto e 200 mM de NaCl a fim de precipitar os ácidos nucléicos. Os microtubos foram incubados a -20 °C durante a noite. Após, foi realizada a centrifugação por 15 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com 200 µL de etanol 70 %. Por fim, o álcool foi evaporado à temperatura ambiente e o material ressuspendido em 20 µL em água MilliQ. O resultado da extração foi verificado com gel de agarose 1% imerso em tampão TAI 1X em cuba de eletroforese e a presença de DNA confirmada com Transluminador UV.

#### 4.1.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A identificação do fungo foi baseada no sequenciamento parcial da região intergênica do rDNA ITS e parte do gene da  $\beta$ -tubulina. Para a PCR foram utilizados os *primers* universais para identificação dos fungos ITS 1 (5'-tccgtaggtgaacctgcgg-3') e ITS 4 (5'-tcctccgctttattgatgc-3') como *primers forward* e *reverse*, respectivamente, e preparados em solução de 50 µL conforme a Tabela 4.2.

**Tabela 4.2:** Componentes utilizados no mix de PCR.

Componente	Volume	Concentração Final
10X Standard Taq Reaction Buffer	5,0 µL	1X
10 mM dNTPs	1,0 µL	200 µM
ITS 1 a 10 µM	1,0 µL	0,2 µM (0,05 – 1 µM)
ITS 4 a 10 µM	1,0 µL	0,2 µM (0,05 – 1 µM)
DNA Molde	100 ng	<1000 ng
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0,25 µL	1,25 unidades/50µL PCR
Nuclease-free water	Até 50 µL	

As condições da PCR ajustadas no Termociclador foram: desnaturação inicial por 5 minutos a 95 °C; 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C para desnaturação; 1 minuto e 30 segundos a 46 °C para o anelamento dos *primers*; 80 segundos a 72 °C para extensão e 7 minutos a 72 °C para extensão final. O produto de PCR foi avaliado através de gel de agarose 1% e posteriormente purificado para o sequenciamento da seguinte maneira: 18 µL do produto de

PCR foram adicionados 1,9  $\mu$ L de acetato de amônio 7M e 20  $\mu$ L de isopropanol ambos resfriados a cerca de 6 °C. Essa mistura foi homogeneizada em vórtex por 15 segundos e centrifugadas por 15 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao precipitado 125  $\mu$ L de etanol 70 % à temperatura ambiente e centrifugado por 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado novamente e aguardou-se a evaporação de todo etanol. Foi realizada ressuspensão em 20  $\mu$ L de água MilliQ e deixado por 2 horas a 37 °C em banho úmido ou durante a noite à temperatura ambiente.

Os *primers* Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') e Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') foram utilizados para o gene da  $\beta$ -tubulina como *forward* e *reverse*, respectivamente. As condições ajustadas foram: 32 ciclos de 94 °C para desnaturação durante 1 min; 58 °C para emparelhamento por 1 min; 72 °C para extensão por 1 min e uma extensão final por 10 s a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados num gel de agarose a 0,9% e armazenados a -20 °C.

#### 4.1.2.3 Sequenciamento das amostras

O sequenciamento enzimático Sanger usando o kit BigDye Terminator v3.1 foi realizado na empresa Genomic Engenharia Molecular Ltda, CNPJ 65.870.297/0001-91, localizada em São Paulo.

#### 4.1.2.4 Edição e análise das sequências

As sequências foram editadas manualmente, inspecionando os cromatogramas gerados pelo sequenciador. Após a edição, a busca por sequências homólogas foi realizada no *Standard Nucleotide BLAST* (NCBI, 2018), de acordo com sequências homólogas.

## 4.2 Produção de biocorantes

A produção de biocorantes foi realizada por cultivo submerso em triplicata com os fungos filamentosos selecionados, conforme procedimentos a seguir descritos.

### 4.2.1 Preparação de culturas reativadas dos fungos filamentosos e preparação das suspensões de esporos para inoculação

As culturas de fungos filamentosos selecionadas foram reativadas separadamente por sucessivas transferências das cepas, com uso de alça de platina, para novas placas de Petri com

39 g/L de substrato estéril de batata dextrose ágar (BDA) da marca Oxoid e incubadas em estufa microbiológica DeLeo com controlador de temperatura TLZ-10 por 9 dias a 30 °C. As culturas reativadas foram utilizadas para testes de cultivos em placa de petri, preparação de inóculo para cultivos submersos ou conservação sob refrigeração a -4 °C.

As suspensões de esporos dos fungos foram preparadas separadamente adicionando 5mL de solução aquosa 0,01% Tween 20 esterilizada em cada placa com cultura reativada, sendo os esporos cuidadosamente agitados com auxílio de alça de Drigalsky. Após as suspensões de esporos foram transferidas para tubos falcon esterilizados, centrifugadas por 10 min a 6000 rpm para retenção das hifas e, por fim, diluídas 100 vezes em água estéril para contagens de esporos em microscópio óptico utilizando câmara de Neubauer.

A esterilização de soluções, reagentes, vidrarias e outras ferramentas foram realizadas em autoclave da marca durante 30 min a 121°C. As preparações de culturas reativadas e inoculações foram realizadas dentro da capela de fluxo laminar com a chama no bico de Bunsen acesa, previamente limpa com álcool 70 GL e esterilizada por luz UV durante 15 min.

Para seleção dos biocorantes com potencial utilização no tingimento de couro foi observada a coloração formada no cultivo em placa de petri e no cultivo submerso.

#### **4.2.2 Cultivo submerso**

Nos experimentos de produção de biocorante extracelular por cultivo submerso, cada fungo filamentoso foi inoculado separadamente na concentração de  $10^6$  esporos/mL em erlenmeyer de 250 mL, contendo 40 mL de caldo batata dextrose (BD) da marca Acumedia em concentração de 24 g BD/L e pH 5,1 e incubados em agitador rotativo da marca Marconi, modelo MA832, a 125 rpm e 30 °C durante 2 a 5 semanas. Após o período de cultivo, o biocorante foi extraído por meio de centrifugação por 25 min a 6000 rpm e filtração à vácuo com membranas de GF/C de 0,22  $\mu$ m previamente pesada. Os corantes foram concentrados a 2% de total de sólidos no evaporador rotativo a vácuo a 60 °C para uso no tingimento de couro sem adição de água. As membranas contendo as biomassas fúngicas foram lavadas duas vezes com água deionizada, secas a 105 °C durante 15 h ou até atingir massa constante e pesada novamente. As determinações de biomassa foram calculadas pela diferença entre as massas final e inicial das membranas secas.

### 4.2.3 Determinação da densidade óptica

As determinações das densidades ópticas (DO) dos biocorantes extracelular foram determinadas em triplicata por varredura dos extratos fúngicos quanto ao seu espectro de absorção na faixa de 350-700 nm utilizando espectrofotômetros de duplo feixe *Cary 1-E* da marca Varian e T80+ da PG *Instruments*, ambos equipados com lâmpadas de deutério e de halogênio. As análises iniciaram a partir da alteração da cor do cultivo constatada visualmente. O rendimento de biocorante foi expresso como unidades de densidade óptica por grama de substrato seco multiplicado pelo seu fator de diluição e os valores de absorbância são convertidos em unidades de cor.

### 4.2.4 Análise colorimétrica

As análises colorimétricas foram realizadas utilizando colorímetro da marca Delta Color e modelo *Colorium 3*, de acordo com sistema CIELAB e com lâmpada D65, ângulo de 10° iluminante/observador, geometria óptica de 45/0°, Tolerância CMC e razão de luminosidade / croma de 2/1. Os parâmetros são Luminosidade ( $L^*$ ) lidas de zero (preto) a 100 (branco), verde ( $-a^*$ ) a vermelho ( $+a^*$ ), azul ( $-b^*$ ) a amarelo ( $+b^*$ ), croma ( $C^*$ ) que denota a saturação ou pureza dos valores do ângulo de cor e matiz (h) para representar o grau de vermelhidão, amarelecimento, verde e azul (0, 90, 180 e 270, respectivamente). O colorímetro foi calibrado em relação aos fundos branco e preto padrão.

### 4.2.5 Análises de espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras de biocorantes concentrados dos fungos *Aspergillus niger* IFL5, *Penicillium chrysogenum* IFL1, *Penicillium herguei*, *Penicillium vasconiae* IFL4 e *Monascus purpureus* NRRL1992 foram analisadas por FT-IR no Departamento de Química e Física da Universidade de Santa Cruz do Sul. Os biocorantes foram aplicados sobre *probes* de alumínio, secos até formar um filme homogêneo e analisadas por um FTIR.

As análises de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier do biocorante de *Monascus purpureus* e caldo batata dextrose foram também realizadas na empresa Tanac S.A. utilizando um espectrofotômetro modelo Perkin Elmer Spectrum 400 equipado com detector DTGS na faixa espectral de 4000-650  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e

32 varreduras. Para a realização do espectro, foi depositado um filme fino de cada amostra sobre uma pastilha de brometo de potássio.

### 4.3 Testes de tingimento do couro

Para avaliar o potencial de tingimento dos biocorantes em couro e testar as condições de aplicação do tingimento foram feitos testes em escala de bancada e também foi aplicada a formulação ajustada em tingimento em escala piloto, conforme descrito a seguir.

#### 4.3.1 Testes de condições de tingimento em escala de bancada

Inicialmente foram realizadas avaliações do potencial de tingimento do couro dos biocorantes concentrados de *A. niger* IFL5, *P. chrysogenum* IFL1, *P. herguei*, *P. vasconiae* IFL4 e *M. purpureus* NRRL1992. Posteriormente, o biocorante de *Monascus purpureus* NRRL1992 foi selecionado para os testes de estudo das condições adequadas de tingimento.

Os tingimentos de bancada foram realizados no Laboratório de Estudos em Couro e Meio Ambiente (LACOURO), a partir de amostras de couro *wet-blue* de (15 x 15) cm<sup>2</sup> e espessura de 2,0-2,2 mm, utilizando fulão de bancada da marca HAAKE, modelo W36, equipado com controlador de temperatura e velocidade de rotação, mostrado na Figura 4.1.

**Figura 4.1:** Sistema de fulão utilizado nos tingimentos de bancada.



As amostras de couro foram processadas conforme a formulação da Tabela 4.3. A desacidulação foi feita usando bicarbonato de sódio, formiato de sódio e surfactante (Borron ANV, da empresa TFL). O tingimento foi realizado com uma ou duas adições de 2% de corante (% m/m sobre o peso do couro) durante 2 horas, a primeira adição visa promover a penetração



do corante no couro e a segunda adição visa dar uma coloração superficial mais intensa. A temperatura foi aumentada para 50 °C na etapa de fixação do corante com ácido fórmico ou cítrico. Os produtos químicos, tanino de dupla condensação naftalénica (Syntac DC, da empresa Tanac S.A) e amina etoxilada (Invaderm LU, da empresa TFL) foram usados como auxiliares de tingimento. As condições de tingimento testadas foram:

- ajuste do pH de desacidulação das amostras em 4, 5 ou 6;
- uso ou não de auxiliares químicos (Syntac DC e Invaderm LU) no tingimento;
- teste de segunda etapa de adição de corante a 50 °C (remonte).
- teste do tipo de ácido usado na fixação: ácido fórmico ou cítrico. Para os testes de verificação da influência do tipo de ácido de fixação, uso de auxiliares e etapa de remonte foi utilizada como condição padrão o ajuste de pH de desacidulação em 5,0.

**Tabela 4.3:** Formulação de tingimento de bancada.

Etapa	Insumos	(%)	Condições e controle de processo			
			t (min)	T (°C)	pH	Controle
Desacidulação	Água	500	30	25	4, 5 ou 6 <sup>(1)</sup>	Esgotar banho
	Formiato de sódio	0,45				
	Bicarbonato de sódio	0,30				
	Borron ANV	0,40				
Tingimento	Água	100,00	10	25		Verificar o atravessamento do corante
	Syntac DC <sup>(2)</sup>	4,00				
	Invaderm LU <sup>(2)</sup>	1,00				
	Biocorante	2,00				
Fixação	Água	400,00	20	50	3,5	Esgotar banho
	Ácido <sup>(3)</sup>	2,00	20			
Remonte	Água	200,00	30	50	3,2	Verificar a cor do couro
	Biocorante <sup>(4)</sup>	2,00				
	Ácido	1,00				
Lavagem	Água	400,0	10	25		Esgotar banho

<sup>1</sup>Teste do pH de desacidulação; <sup>2</sup>Teste de uso ou não de auxiliares químicos; <sup>3</sup>Teste do tipo de ácido;

<sup>4</sup>Teste de remonte.

As determinações visuais de atravessamento do biocorante foram realizadas efetuando cortes nas amostras tingidas para revelar o quanto o corante penetrou ao longo de sua seção transversal. Os tingimentos somente foram finalizados quando a distribuição de corante estivesse completa ou satisfatória. Ao final do tingimento, a amostra foi estirada e seca naturalmente.

#### 4.3.2 Tingimento em escala piloto

O tingimento com biocorante *Monascus purpureus* em escala piloto foi realizado no Curtume Piloto da Tanac S.A a partir de amostras de couro *wet-blue* de (40 x 40) cm<sup>2</sup> e a formulação colocada na Tabela 4.4. O couro após tingido sofreu todas as etapas de usuais de produção, como lavagem, secagem e estiramento.

**Tabela 4.4:** Formulação de tingimento em escala piloto de couro *wet-blue* com corante produzido por *Monascus purpureus*.

Etapa	Insumos	(%)	Condições e controle de processo			
			t (min)	T (°C)	pH	Controle
Lavagem	Água	200	20	25		Esgotar banho
Desacidulação	Tensoativo	0,2				
	Água	100	30	25		
	Formiato de sódio	2,0				
	Bicarbonato de sódio	0,5	30		5,0	Esgotar banho
Tingimento	Água	100		25		Verificar
	Biocorante	2,0	60			Atravessamento
Fixação	Água	100		25		
	Ácido Fórmico	2,0	30		3,6	Esgotar banho

#### 4.3.3 Absorção de corante pelo couro

O biocorante absorvido pelo couro foi calculado pela análise de aproveitamento da concentração do mesmo (esgotamento) presente no banho de tingimento. Analisou-se para tal, as densidades ópticas inicial e final do banho de tingimento nos comprimentos de onda de 402, 420, 428, 440 e 490 nm, referente à máxima absorção de cada biocorante, sendo a porcentagem de exaustão do biocorante calculada usando a equação 4.1.

$$\text{Percentual de exaustão de corante} = \frac{DO_I - DO_F}{DO_I} \times 100 \quad (4.1)$$

Onde:

$C_I$  = Densidade óptica inicial do banho de tingimento;

$C_F$  = Densidade óptica final do banho de tingimento.

#### **4.3.4 Testes de estabilidade da cor**

##### **4.3.4.1 Estabilidade da cor à luz ultravioleta**

As análises de estabilidade (solidez) da cor foram realizadas nas amostras de couros tingidas em escala piloto e procedidas de acordo com a ABNT NBR 14392: 2013 expondo as mesmas à ação de luz ultravioleta padrão utilizando lâmpada UV de 300 W e controle de temperatura não superior à 35°C.

As alterações de cor das amostras de couro foram determinadas pelo sistema colorimétrico CIELAB e comparadas à escala de cinza de acordo com a ISO 105-A05:1996. A classificação de solidez variou de Grau 5 (sem alteração visual, melhor classificação) para Grau 1 (grande alteração visual, pior classificação). A diferença total de cor ( $\Delta E$ ) após os tratamentos foi calculada pela seguinte equação 4.2.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*{}^2) + (\Delta a^*{}^2) + (\Delta b^*{}^2)}. \quad (4.2)$$

##### **4.3.4.2 Estabilidade térmica**

Os testes de estabilidade de cor por envelhecimento acelerado foram realizados nos couros tingidos em escalas bancada e piloto, de acordo com a ISO DIS 17228: 2013 (IUF 412), expondo as amostras a aquecimento em forno com circulação de ar a 60 °C (método 6A) e 100 °C (método 6B) durante 24 h. As alterações da cor das amostras de couro foram determinadas pelo sistema colorimétrico CIELAB e comparadas à escala de cinza.

##### **4.3.4.3 Estabilidade à migração para PVC plastificado**

Os testes de determinação da estabilidade da cor à migração em policloreto de vinila (PVC) plastificado foram realizados nos couros tingidos em escala de bancada de acordo com a norma EN ISO 15701:1998 (IULTCS/IUF 442). O lado da amostra a ser testado foi colocado em uma folha branca pigmentada de PVC plastificado e exposto a temperatura de 50 °C e

pressão em um aparelho apropriado por 16 horas. As análises de solidez da cor foram comparadas aos padrões da escala de cinza segundo a ISO 105-A02:1993.

#### 4.3.5 Verificação da presença de fungo nos couros tingidos

Este teste teve a finalidade de verificar se o biocorante de *Monascus purpureus* apresentou influência negativa numa possível contaminação fúngica do couro tingido, comparativamente com corante comercial. As verificações quantitativas de presença de fungos foram realizadas em dois corpos-de-prova do mesmo couro *wet-blue* tingidos (escala piloto) separadamente com o corante comercial Melioderm HF vermelho G da Clariant e o biocorante de *Monascus purpureus*, baseadas na norma ABNT NBR 14240:2012.

Os couros foram moídos, diluídos em tampão de fosfato contendo Tween 80 na proporção de 10 g para 90 ml, respectivamente, e incubados em agitador por 30 minutos na rotação de 300 rpm para extração dos fungos. Posteriormente, os fungos que cresceram nestas condições foram cultivados em placas de Petri com Batata Dextrose Agar por 10 dias a 30°C e, após esse período, a quantidade de microrganismos foi determinada por microscópio. A Tabela 4.5 demonstra a escala de avaliação dos números de fungos por centímetro quadrado superfície.

**Tabela 4.5:** Avaliação do número de fungos por grama de couro tingido.

Números de células de fungos por grama de material	Avaliação
0 até $1 \times 10^2$	Baixa contaminação
$1,1 \times 10^2$ até $1 \times 10^3$	Média contaminação
Maior do que $1,1 \times 10^3$	Alta contaminação

#### 4.4 Cultivo submerso com pelo hidrolisado como substrato

O resíduo de pelo bovino da indústria coureira foi utilizado como matéria-prima para o desenvolvimento de um potencial substrato, fonte de carbono e nitrogênio, para cultivo submerso de *Monascus purpureus*.

#### 4.4.1 Origem e caracterização do resíduo

O resíduo de pelo bovino foi obtido do processo de depilação da pele salgada com conservação de pelo do Curtume Fridolino Ritter Ltda, estabelecido na rodovia Pres. Getúlio Vargas, Picada Café, RS. As propriedades químicas do pelo encontram-se na Tabela 4.6.

**Tabela 4.6:** Propriedades químicas do pelo bovino utilizado.

Características	Composição (% base seca)
Cinzas	0,05 ± 0,01
Carbono total	53,21 ± 2,59
Nitrogênio	5,37 ± 0,05
Matéria volátil	10,46 ± 0,18

Fonte: Mella e Gutterres (2017b).

Após a depilação com conservação de pelo, o resíduo sólido é separado do efluente líquido por peneiramento e reutilizado como composto orgânico para a agricultura. O processo de depilação da pele com conservação de pelo do Curtume está colocado na Tabela 4.7.

**Tabela 4.7:** Descrição do processo de depilação da pele com conservação de pelo.

Etapa	Insumo	Tempo (h)
Depilação 1	60% água de reciclo + 40% de água limpa	4
	0,2% tensoativo	
	0,3% remolhante enzimático	
	0,9% auxiliar depilação, isento de sulfeto	
	0,8% cal	1
	0,3% auxiliar depilação, isento de sulfeto	0,5
	0,85% sulfeto	
	0,2% tensoativo	
0,06% enzima		
Peneiramento do pelo		
Depilação 2 para retirada das rufas da pele	0,2% sulfeto	1
	0,06% enzima	
	1,9% cal	
	0,05% sulfeto	1

#### **4.4.2 Preparação do pelo hidrolisado**

Os pelos bovinos foram lavados extensivamente com água deionizada até o efluente gerado atingir  $\text{°Be} = 0$ , indicando a ausência de sujidades na amostra tais como parasitas do animal, terra, cloreto de sódio e outras. Posteriormente, a amostra foi seca em estufa a  $70^{\circ}\text{C}$  por 24 h e resfriada em dessecador até temperatura ambiente. Os pelos secos foram moídos em moinho de facas da marca Lucadema Científica, modelo Luca 226/1 e separados por peneiramento e retidos na peneira de 65 mesh. A hidrólise do pelo bovino foi realizada com solução de ácido clorídrico 6 N sob agitação circular por 24 h a  $60^{\circ}\text{C}$  e ajustado pH 3,0 ou 6,5 com solução de hidróxido de sódio 6N. Por fim, o volume da solução foi ajustado para 1 L em balão volumétrico.

#### **4.4.3 Cultivo submerso de *Monascus purpureus* com substrato de pelo bovino hidrolisado**

Nos testes de cultivo submerso de *Monascus purpureus* com substrato de pelo bovino hidrolisado (PBH) para produção de corante, a inoculação foi realizada por adição de três pedaços de micélio retirados radialmente da cultura reativada de *Monascus purpureus* com ponteira de micropipeta de 1000  $\mu\text{L}$  esterilizada.

Os cultivos submersos foram realizados em triplicata na concentração de 5 g/L por 12 dias a  $30^{\circ}\text{C}$ , comparativamente com os meios de cultura comerciais caldo batata dextrose, peptona, peptona com batata dextrose e dextrose nas mesmas condições.

A Tabela 4.8 apresenta um resumo dos procedimentos aplicados neste trabalho para os respectivos fungos.



## Capítulo 5

### Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados dos experimentos realizados no presente trabalho, sendo estruturado em três partes distintas. Na primeira parte é tratado da pesquisa de fungos filamentosos identificados como potenciais produtores de biocorantes encontrados na literatura, e obtidos no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da UFRGS e no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). Posteriormente são relatados os cultivos em placa de petri e submerso com substrato batata dextrose das nove cepas pré-selecionadas (LPM 1473, LPM 1504, *Aspergillus niger* IFL5, *Penicillium chrysogenum* IFL1, *Penicillium herguei*, *Penicillium vasconiae* IFL4, *Monascus purpureus* NRRL1992, *Fusarium oxysporium* e *Fusarium graminearum*) para verificação da produção de biocorante extracelular. Ainda consta a identificação molecular realizada no fungo LPM 1473 e caracterização dos extratos coloridos por espectroscopia FTIR, UV-vis e colorimetria. Na sequência são apresentados e discutidos os resultados de produção, extração e concentração dos biocorantes selecionados para aplicação no tingimento de couro. A segunda parte compreende os testes de tingimento procedidos em couro *wet-blue* com o biocorante extraído a partir do fungo filamentoso *Monascus purpureus*, seguido por testes visuais, de estabilidade de cor e de presença de contaminação fúngica na amostra tingida. Na parte final são abordados os resultados de desenvolvimento do meio de cultivo a partir de resíduo de pelo bovino conservado obtido do processo industrial de depilação de peles e utilização deste para produção de biocorante por *Monascus purpureus* em cultivo submerso, comparativamente com substratos comerciais normalmente utilizados.



## 5.1 Seleção de fungos filamentosos produtores de biocorantes

Primeiramente foi realizada uma busca na literatura acadêmica de Centros de estudos com biocorantes no Brasil. Assim, houve a oportunidade de conhecer presencialmente os estudos sobre fungos filamentosos e estrutura pertinente do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFRGS) e do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

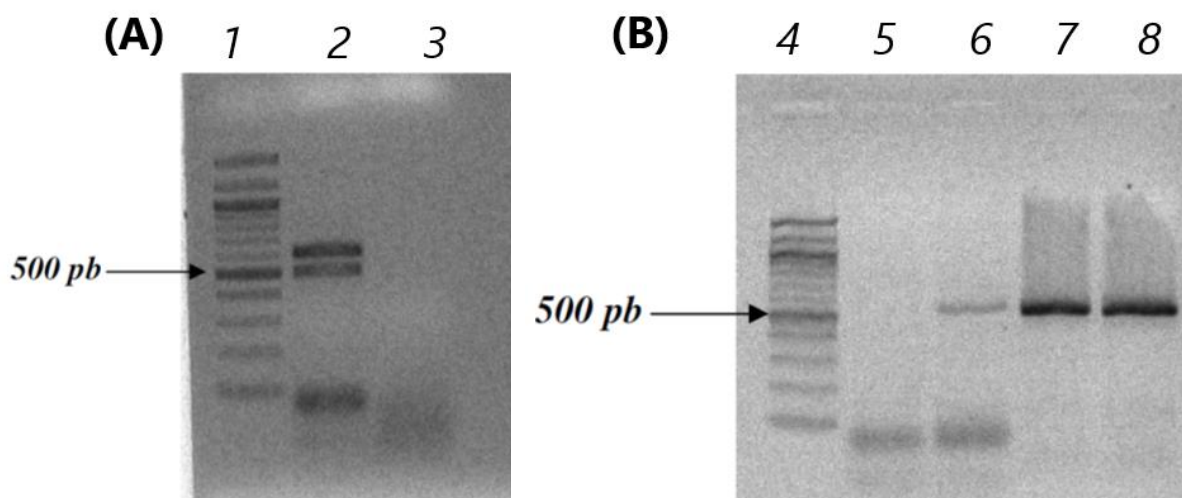
### 5.1.1 Identificação molecular do fungo LPM 1473

A identificação molecular do fungo LPM 1473 foi uma contrapartida pela transferência do material e uma oportunidade de abranger o conhecimento de um novo procedimento.

Primeiramente foram realizados os procedimentos de extração do DNA genômico do fungo, seguido pela reação da cadeia polimerase com os primers ITS e gene parcial  $\beta$ -tubulina no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (UFRGS). O material foi então enviado para a empresa Genomic realizar a purificação e sequenciamento das bandas.

A eletroforese em gel para as bandas purificadas está apresentada na Figura 5.1. Na amplificação com primers ITS1 e ITS4 foram obtidas bandas com 500 e 600 pb, e na amplificação com primers Bt2a e Bt2b foi obtida uma banda com aproximadamente 550 pb.

**Figura 5.1:** Eletroforese em gel de agarose mostrando os produtos de PCR da região ITS (A) e o gene parcial  $\beta$ -tubulina (B). Lanes 1,4 = padrão de peso molecular; lane 2 = produto dos primers ITS; lane 3,5 = controle negativo (sem DNA alvo para amplificar); lane 7,8 produtos dos primers  $\beta$ -tubulina.



Em ambos géis as bandas difusas com tamanhos inferiores a 100 pb são primers não consumidos pela PCR ou dímeros de primers, e é normal as ver.

As sequências foram submetidas ao programa BLAST e a identificação molecular realizada com o fungo LPM 1473 revelou 99% de identidade com *Chaetomium aureum* Chivers, também designado como *Arcopilus aureus* (Mycobank, 2018), conforme Tabela 5.1.

**Tabela 5.1:** Identificação molecular realizada com o fungo LPM 1473.

Primer	Fragmento	Identificação	Identidade (%)
ITS 1	500	Nenhuma similaridade encontrada	-
ITS 1	600	<i>Arcopilus aureus</i> G4	99
ITS 4	500	<i>Arcopilus aureus</i> KTMT1	99
ITS 4	600	<i>Chaetomium aureum</i> QRF387 18S	99
Bt2a	550	<i>Arcopilus aureus</i> CBS 538.73	99
Bt2b	550	<i>Arcopilus aureus</i> CBS 538.73	99

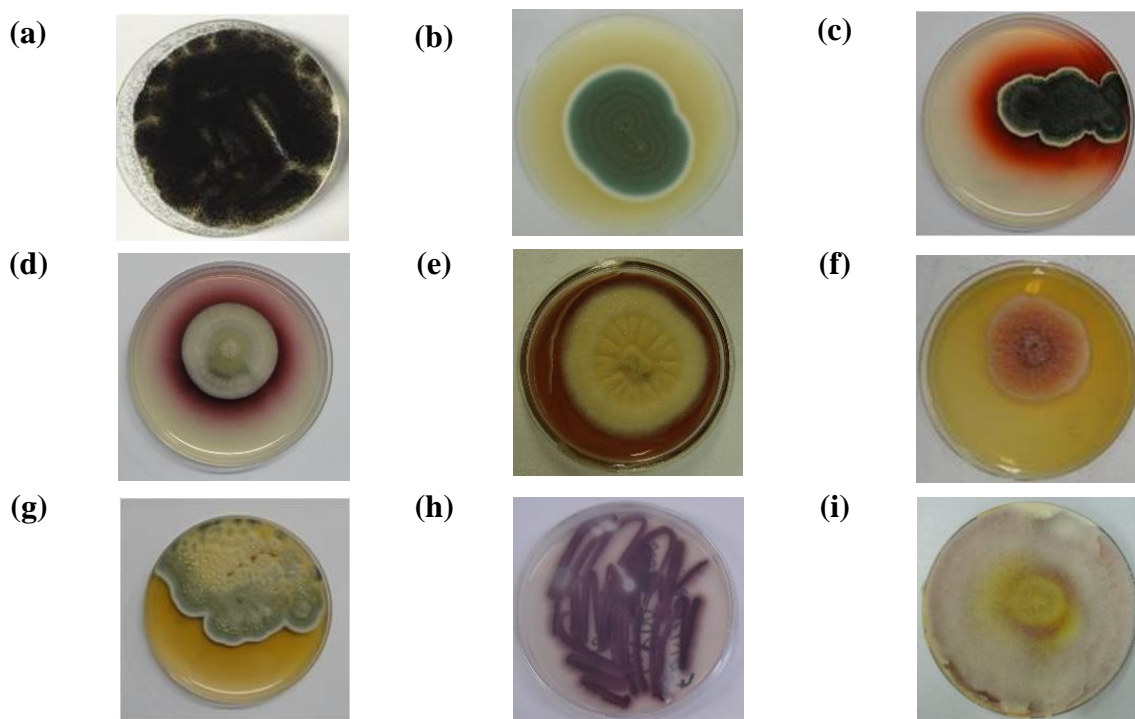
Fonte: NCBI, 2018.

### 5.1.2 Cultivo em placas de petri

Os fungos filamentosos testados como produtores de biocorantes foram identificados por Lopes *et al.* (2011) como *A. niger* IFL5, *P. chrysogenum* IFL1, *P. herguei*, *P. vasconiae* IFL4, *M. purpureus* NRRL1992, *F. oxysporium* e *F. graminearum* e também os fungos *Chaetomium aureum* e LPM 1504.

Os fungos foram reativados através de transferências em placas de petri com ágar Batata Dextrose e produzem cores preta (a) amarela (b, g, i), vermelha (c, d, e, f) e violeta (h), conforme apresentado na Figura 5.2.

**Figura 5.2:** Culturas reativadas dos fungos filamentosos (a) *A. niger*, (b) *P. chrysogenum*, (c) *P. herguei*, (d) *Chaetomium aureum*, (e) LPM 1504, (f) *M. purpureus*, (g) *P. vasconiae*, (h) *F. oxysporium* e (i) *F. graminearum* em placas de petri.



Na sequência, todas as culturas reativadas foram utilizadas para produção de biocorante por cultivo submerso em triplicata.

### 5.1.3 Cultivo submerso

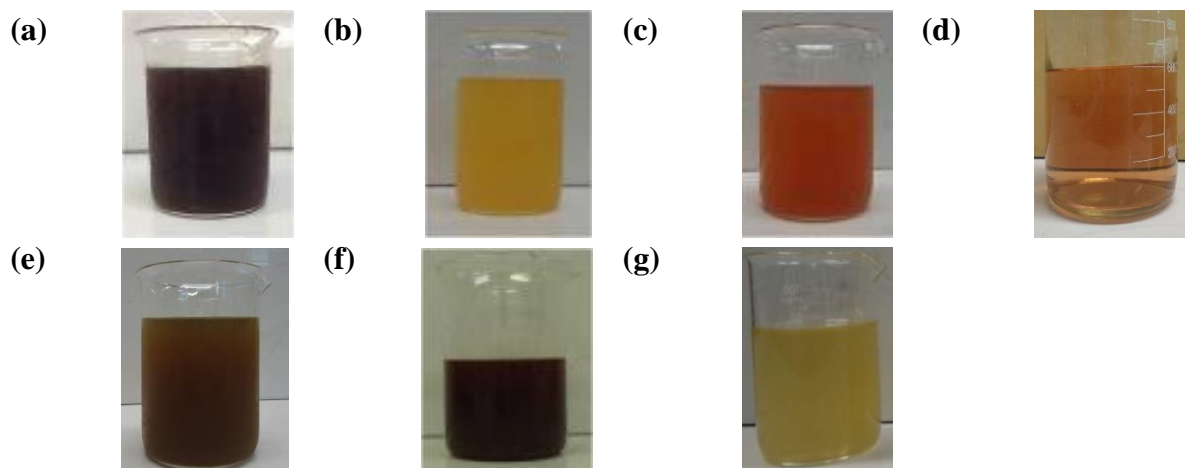
Os cultivos submersos com as culturas reativadas em 24 g.L<sup>-1</sup> de substrato batata dextrose por 3 semanas a 30 °C estão apresentados na Figura 5.3. Os fungos *F. oxysporium* e *F. graminearum* não produziram cor nas condições testadas e foram descartados. Conforme apresentado na Figura 5.3, os meios líquidos com biocorantes confirmaram as cores produzidas nas placas, exceto para o extrato do fungo LPM 1504 que produziu cor verde musgo.

**Figura 5.3:** Cultivo submerso com batata dextrose dos fungos filamentosos (a) *A. niger*, (b) *P. chrysogenum*, (c) *P. herguei*, (d) *Chaetomium aureum*, (e) LPM 1504, (f) *M. purpureus* e (g) *P. vasconiae*.



Após o cultivo submerso, os meios foram centrifugados por 25 min a 6000 rpm e filtrados em sistema de filtração à vácuo com membranas de GF/C de 0,22  $\mu\text{m}$ . Por fim, os extratos com biocorantes foram concentrados até 2% de sólidos totais em evaporador rotativo a vácuo a 60 °C para posterior uso no tingimento de couro sem adição de água. Os biocorantes extraídos e concentrados estão apresentados na Figura 5.4.

**Figura 5.4:** Biocorante extraído e concentrado de (a) *A. niger*, (b) *P. chrysogenum*, (c) *P. herguei*, (d) *Chaetomium aureum*, (e) LPM 1504, (f) *M. purpureus* e (g) *P. vasconiae*.



Os fungos *Chaetomium aureum* e LPM 1504 são de difícil cultivo, pois crescem a 25 °C e produzem corante a 5 °C (TTM 004, 2011), necessitando de uma incubadora refrigerada e condições diferenciadas de produção. Além disso, se tornaram não-cultiváveis após algumas passagens, o que inviabilizou o uso destes dois fungos.

Na Tabela 5.2 estão apresentados os dados de cor, de unidade de absorção (UA) por grama de substrato no máximo comprimento de onda e os dados colorimétricos dos biocorantes selecionados para continuação dos trabalhos.

**Tabela 5.2:** Dados colorimétricos dos biocorantes dos fungos filamentosos.

Biocorante	Cor	UA/g	Dados colorimétricos				
			L*	a*	b*	C	H
<i>Aspergillus niger</i>	Marrom	2,46	31,25±0,28	35,12±0,09	43,02±0,26	55,53±0,14	50,77±0,24
<i>Monascus purpureus</i>	Amarela	6,68	25,48±0,16	47,78±0,10	37,97±0,18	61,03±0,04	38,48±0,19
	Vermelha	12,29					
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Amarela	1,97	52,34±0,01	-0,51±0,02	22,61±0,03	22,62±0,02	91,29±0,06
<i>Penicillium herguei</i>	Vermelha	0,45	48,79±0,93	5,08±0,01	11,54±0,37	12,61±0,35	66,22±0,62
<i>Penicillium vasconiae</i>	Amarela	0,47	58,55±0,01	-0,06±0,02	9,84±0,03	9,84±0,03	90,33±0,11

Luminosidade (L\*): zero (preto) a 100 (branco); verde (-a\*) a vermelho (+ a\*); azul (-b\*) a amarelo (+ b\*); croma (C\*): saturação ou pureza de cor; matiz (h): grau de vermelhidão, amarelecimento, verde e azul (0, 90, 180 e 270).

De acordo com os dados da Tabela 5.2, entre os corantes estudados, o biocorante de *M. purpureus* apresentou a coloração mais intensa com o menor valor de luminosidade (L\* = 25,48) e a maior pureza de cor (C\* = 61,03). Por outro lado, o biocorante com maior luminosidade foi o extrato de *P. vasconiae* com o valor L\* = 58,55. A maior absorção de biocorante foi do *M. purpureus* (12,29 ± 0,76 UA490).

O comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{max}$ ) a 410 nm e os valores positivos de b\* dos extratos de *P. chrysogenum* e *P. vasconiae* confirmam a predominância de cores amarelas, nos quais o primeiro biocorante tem uma maior saturação. O comprimento de onda de absorção máxima ( $\lambda_{max}$ ) a 490 nm e os valores positivos a\* dos extratos de *M. purpureus* e

*P. herguei* indicam a predominância de cores vermelhas, nos quais o primeiro biocorante tem maior saturação. O valor do ângulo de matiz de 38,48 sugere que a cor do extrato de *M. purpureus* varia de vermelho a laranja com base no sistema de cores CIELAB. Os parâmetros colorimétricos do extrato de *M. purpureus* foram semelhantes aos relatados (Lopes *et al.*, 2013a; Mapari *et al.*, 2006). A cor marrom-escuro do extrato de *A. niger* é possivelmente devida à formação de melanina (Solano, 2014), resultando em altos valores de  $a^*$  35,12 e  $b^*$  43,02.

#### **5.1.4 Caracterização dos biocorantes por FTIR e UV-vis**

A seguir serão apresentadas e discutidas as caracterizações dos biocorantes realizadas por espectroscopia UV-vis e FTIR.

##### **5.1.4.1 Caracterização do substrato caldo batata-dextrose**

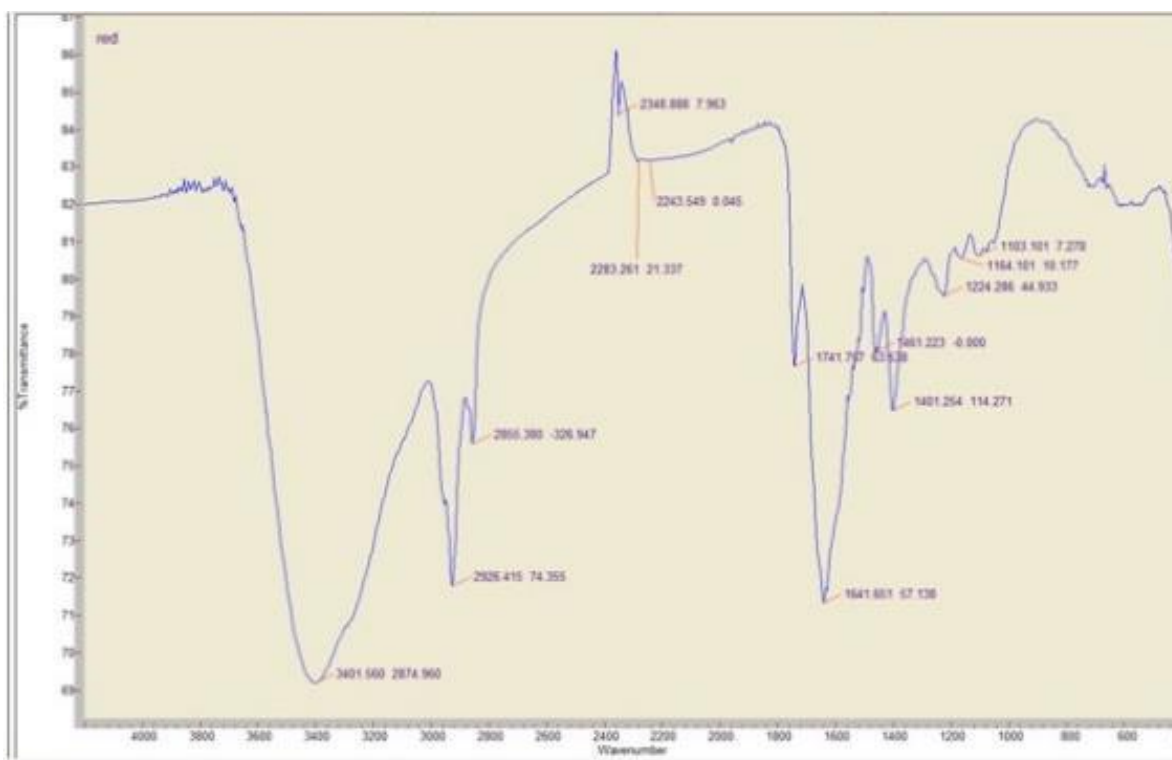
Primeiramente foi analisada por FTIR, como controle, uma amostra do caldo batata-dextrose utilizado para cultivo dos fungos. Conforme apresentado na Figura 5.5, os principais estiramentos do caldo batata dextrose utilizado como substrato no cultivo dos biocorantes são referentes à glicose em 1200 a 900  $\text{cm}^{-1}$  (Kosa *et al.*, 2017). Estes picos também podem ser associados aos polissacarídeos (amido) da batata, e a banda em 1632-1642  $\text{cm}^{-1}$  correspondendo a amida I (proteínas da batata).

A seguir são apresentadas e discutidas as caracterizações dos biocorantes realizadas por espectroscopia FTIR. As análises apresentam influência das bandas vibracionais da água a aproximadamente 3300  $\text{cm}^{-1}$ , 2110  $\text{cm}^{-1}$ , 1635  $\text{cm}^{-1}$  e 580  $\text{cm}^{-1}$ .

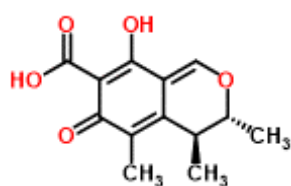
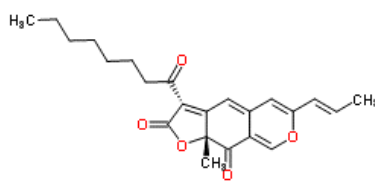
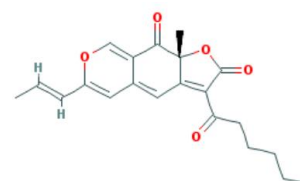
**Figura 5.5:** Espectro de FTIR do caldo batata dextrose utilizado nos cultivos.

#### 5.1.4.2 Biocorante de *Monascus purpureus*

O espectro FTIR da amostra de biocorante de *Monascus purpureus* está apresentado na Figura 5.6 e os principais estiramentos foram em 3401, 2926, 2855, 2283, 2243, 1741, 1641, 1461, 1401, 1224, 1164, e 1103  $\text{cm}^{-1}$ . A forte banda em 3401 sugere a presença de grupo -OH e estiramento de N-H da amida secundária (Mukherjee *et al.*, 2011a,b; Chatterjee *et al.*, 2009; Srivastav *et al.*, 2015). Há também presença dos picos 2926  $\text{cm}^{-1}$  e 2855  $\text{cm}^{-1}$  (C-H estiramento - $\text{CH}_2$ ), 1741  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento C=O, 5-membered cyclic ketone: sistema  $\gamma$ -lactona), 1641  $\text{cm}^{-1}$  (C=C em sistema de ligação dupla conjugada), e 1461  $\text{cm}^{-1}$  de insaturação (Chatterjee *et al.*, 2009). O pico em 2928  $\text{cm}^{-1}$  é muito acentuado, indicando presença de múltiplos grupos  $\text{CH}_2$  (Srivastav *et al.*, 2015; Lian *et al.*, 2007). A diminuição dos estiramentos em 1164 e 1103  $\text{cm}^{-1}$  associados a carboidratos (Salman *et al.*, 2010), sugere que grande parte dos açúcares do meio de cultura foi consumido pelo fungo. A banda em 1641  $\text{cm}^{-1}$  é possivelmente referente a compostos com N de amina (Hilare *et al.*, 2018).

**Figura 5.6:** Espectro FTIR do biocorante de *Monascus purpureus*.

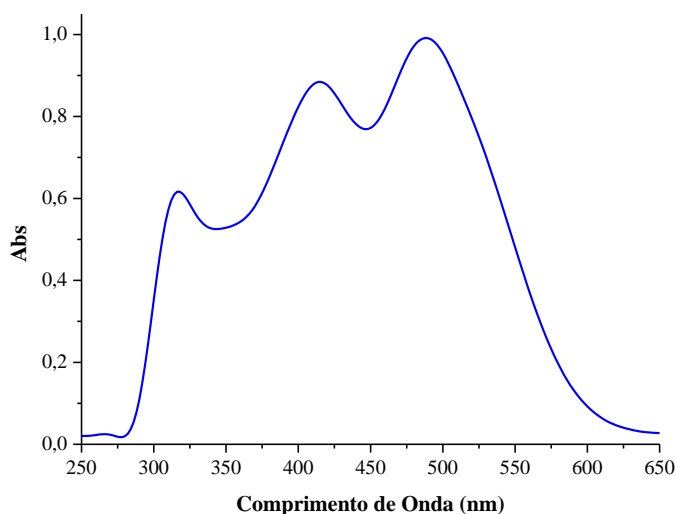
De acordo com Lopes (2013a), o fungo *M. purpureus* NRRL1992 produz como metabólitos secundários os compostos apresentados na Figura 5.7, sendo que os estiramentos presentes no espectro do biocorante estão de acordo com os grupos funcionais dos biocorantes Monascorubrina e Rubropunctatina e da micotoxina Citrinina.

**Figura 5.7:** Metabólitos secundários formados pelo fungo *Monascus purpureus*.Citrinina:  $C_{13}H_{14}O_5$ Monascorubrina:  $C_{23}H_{26}O_5$ Rubropunctatina:  $C_{21}H_{22}O_5$ 

Fonte: Chemspider, 2018.

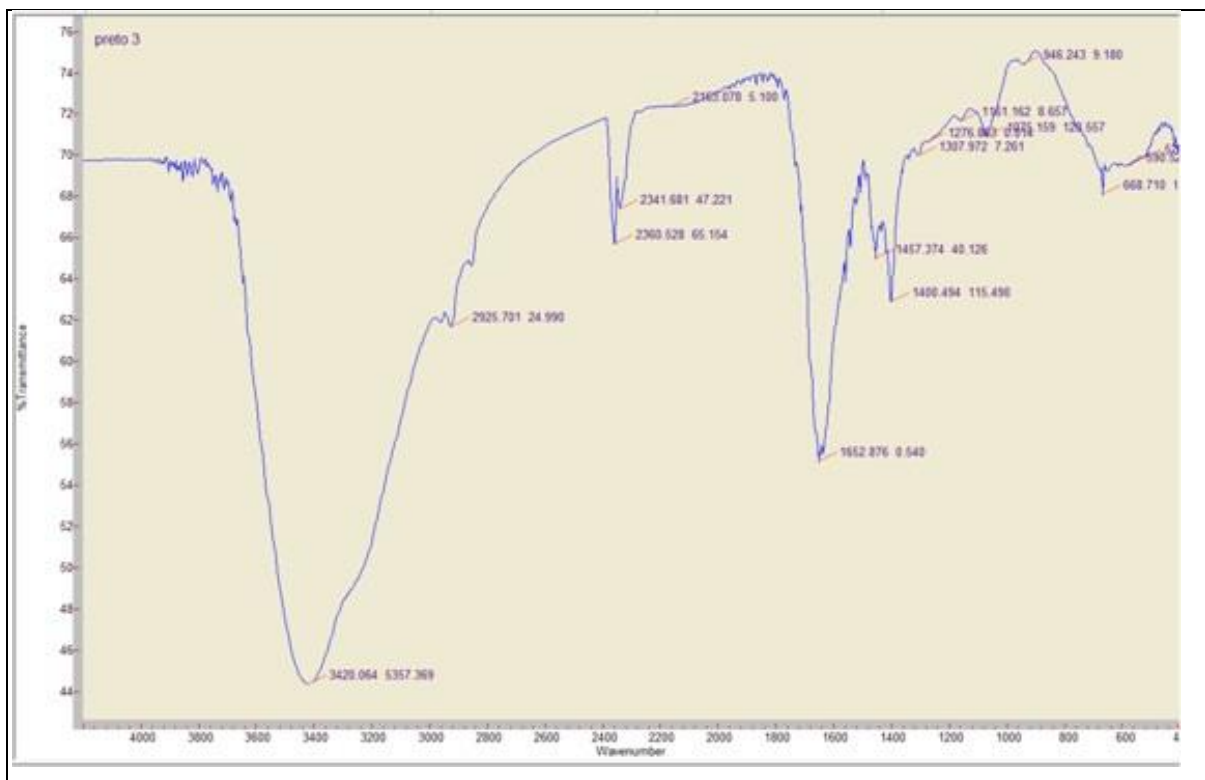
O biocorante produzido por *M. purpureus* apresenta cor vermelha com tonalidade intensa e a Figura 5.8 apresenta a curva de varredura característica. Este biocorante apresenta duas bandas de absorção máxima na faixa de luz visível nos comprimentos de onda de 420 nm e 490 nm, referente às cores amarela alaranjada e vermelha, respectivamente (Aruldass *et al.*, 2018; Dufossé, 2018; Vendruscolo *et al.*, 2016a).



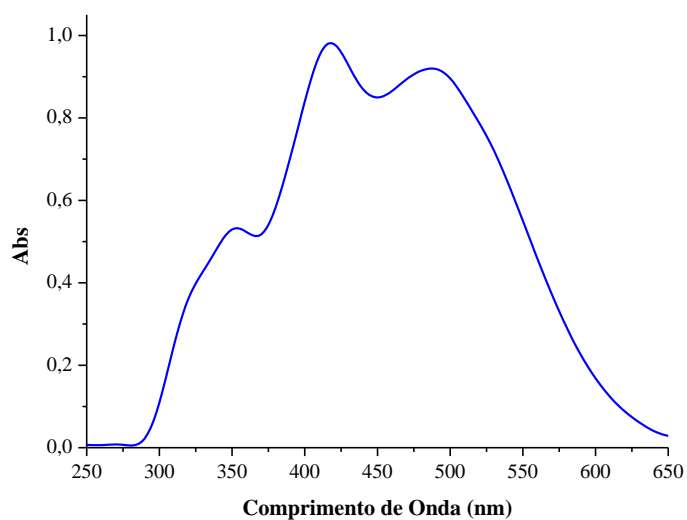
**Figura 5.8:** Espectro UV-visível do biocorante de *Monascus purpureus*.

#### 5.1.4.3 Biocorante de *Aspergillus niger*

As espécies de *Aspergillus* são excelentes produtoras de um grande número de metabólitos secundários (Siddiquee, 2018). No espectro FTIR, apresentado na Figura 5.9, da amostra líquida de biocorante *A. niger*, os principais estiramentos apresentados foram em 3420, 2952, 2925, 1652, 1457 e 1400  $\text{cm}^{-1}$ . A forte banda em 3420  $\text{cm}^{-1}$  é devido a grupos OH, em 2952  $\text{cm}^{-1}$  e 2925  $\text{cm}^{-1}$  aparecem as vibrações de estiramento para ligação CH alifática referente aos compostos de melanina e em regiões de impressão digital entre 1450  $\text{cm}^{-1}$  e 650  $\text{cm}^{-1}$  (Schmaler-Ripcke *et al.*, 2009; D'Ischia *et al.*, 2013). Em 1652  $\text{cm}^{-1}$  consta o estiramento de carbonila (C=O). Conforme estudos de Kogkaki *et al.* (2017), a diferenciação por FT-IR entre os fungos *Aspergillus carbonarius*, *A. niger* e *A. tubingensis* é pouco perceptível devidos aos complexos compostos formados pelas espécies de *Aspergillus* spp. Foram detectadas as ligações de estiramento C-H relacionadas com a absorção de lipídios a 3002-2801  $\text{cm}^{-1}$ , picos largos em 1773-1550  $\text{cm}^{-1}$  e absorção em 1738  $\text{cm}^{-1}$  atribuídos às ligações C=O. Ainda, os picos na região da impressão digital entre 1286 e 952  $\text{cm}^{-1}$  são de alongamento C-O-C e C = S, sendo que os primeiros picos indicam a absorção de fosfolipídios e proteínas, em particular a amida I próxima a 1650  $\text{cm}^{-1}$  e a amida II próxima a 1540  $\text{cm}^{-1}$  e os últimos picos referem-se aos carboidratos. Além disso, a banda de 1150  $\text{cm}^{-1}$  foi correlacionada com as ligações de estiramento de C-O de  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-glucano e os picos em 1089-1091  $\text{cm}^{-1}$  indicam o alongamento simétrico de PO<sub>2</sub> atribuído à absorção de DNA, RNA e fosfolipídios (Kogkaki *et al.*, 2017; Tralamazza *et al.*, 2013; Socrates, 2001).

**Figura 5.9:** Espectro FTIR do biocorante de *Aspergillus niger*.

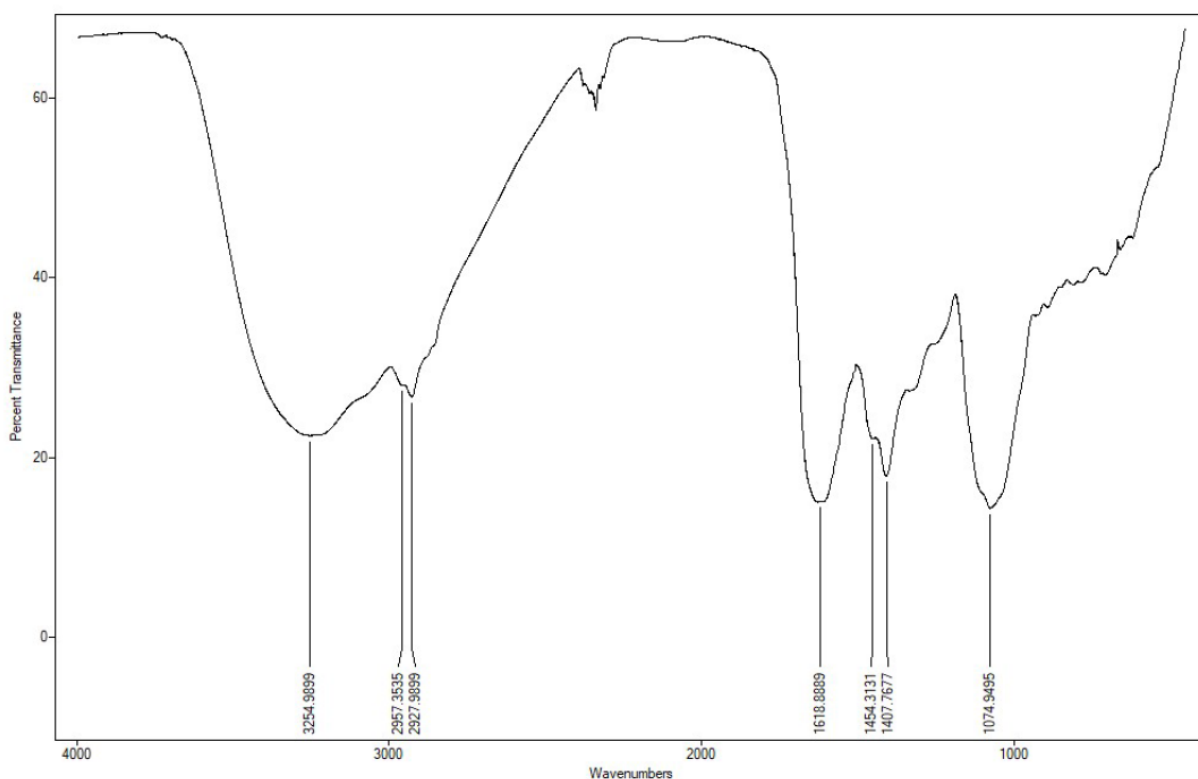
O biocorante produzido por *Aspergillus niger* apresenta cor marrom escura intensa e a Figura 5.10 apresenta a curva de varredura característica. A análise espectrofotométrica UV-vis do composto revelou uma banda espectral entre 400 a 450 nm, similar ao encontrado por Jorgensen, *et al.*, 2011. O comprimento de onda de máxima absorção deste biocorante é em 428 nm possivelmente devido aos compostos de melanina formados (Solano, 2014).

**Figura 5.10:** Espectro UV-visível do biocorante de *Aspergillus niger*.

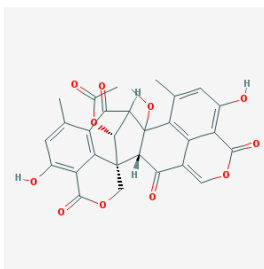
#### 5.1.4.4 Biocorante de *Penicillium herguei*

A Figura 5.11 apresenta o espectro FTIR do biocorante de *P. herguei*, sendo que os principais estiramentos apresentados foram em  $3254\text{ cm}^{-1}$  referente ao grupo hidroxila,  $2957$  e  $2927\text{ cm}^{-1}$  de grupos metil e metileno,  $1618\text{ cm}^{-1}$  de amida secundária,  $1454$  e  $1407\text{ cm}^{-1}$  de estiramento (C-N) e  $1074\text{ cm}^{-1}$  de estiramento (C-O) referente a carboidratos.

**Figura 5.11:** Espectro FTIR do biocorante de *Penicillium herguei*.

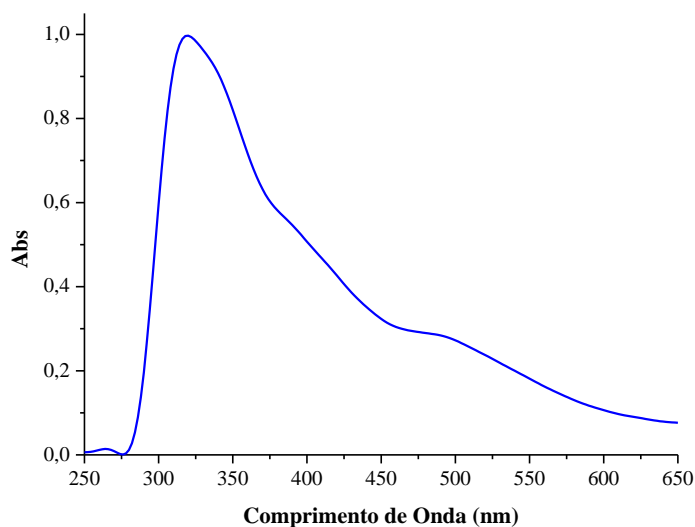


O metabólito secundário Duclauxina, oxafenalenona dimérica com várias propriedades bioativas (Gao *et al.*, 2018), é produzido por *P. herguei* durante cultivo submerso e está apresentado na Figura 5.12. Seu o espectro, utilizando discos de KBr, apresenta principais estiramentos em  $3300$ - $2850$ ,  $1751$ ,  $1703$ ,  $1682$ ,  $1629$ ,  $1567$ ,  $1280$ ,  $1228$ ,  $1200$ ,  $1077$  e  $757\text{ cm}^{-1}$  (Bryant *et al.*, 1993). No entanto, no espectro FTIR do biocorante não constam os estiramentos de carbonila do composto.

**Figura 5.12:** Metabólito secundário formado pelo fungo filamentososo *Penicillium herguei*.Duclauxin: C<sub>29</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>

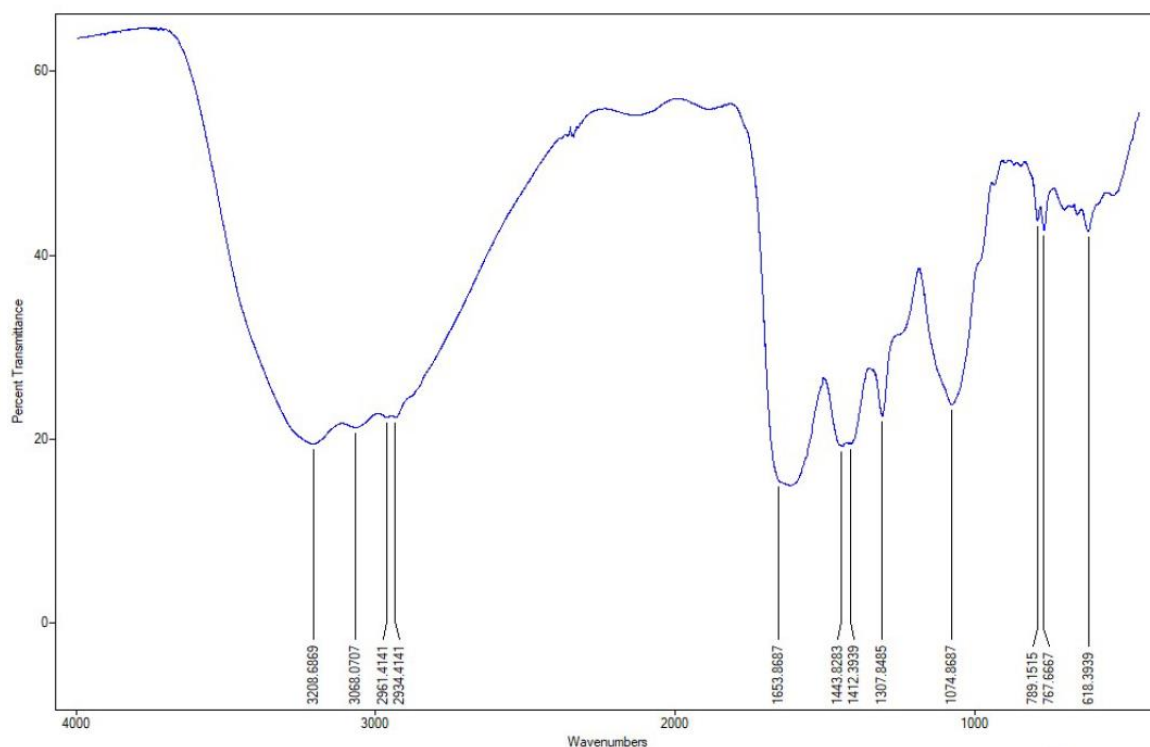
Fonte: Chempider, 2018.

O biocorante produzido por *Penicillium herguei* apresenta cor vermelha clara ou vermelha alaranjada e a Figura 5.13 apresenta a curva de varredura característica. Este biocorante apresenta duas bandas na faixa de luz visível nos comprimentos de 402 nm e 490 nm, referentes às cores amarela e vermelha, respectivamente. O biocorante tem maior absorção na região do UV.

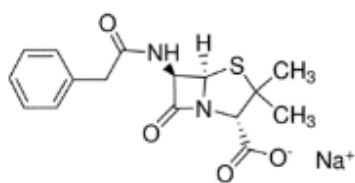
**Figura 5.13:** Espectro UV-visível do biocorante de *Penicillium herguei*.

#### 5.1.4.5 Biocorante de *Penicillium chrysogenum*

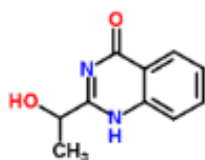
A Figura 5.14 apresenta o espectro FTIR do biocorante de *Penicillium chrysogenum*, sendo que os principais picos apresentados foram em 3208 cm<sup>-1</sup>, 2127 e 580 cm<sup>-1</sup> (bandas de vibração da água), 3066 cm<sup>-1</sup> (insaturação C=C-H e /ou anel aromático), 2961 e 2934 cm<sup>-1</sup> (estiramento de grupos metila e metileno), estiramento de 1653 cm<sup>-1</sup> (amida secundária), 1443 cm<sup>-1</sup> e 1412 cm<sup>-1</sup> (estiramento C-N), 1307 cm<sup>-1</sup> (amida terciária), estiramento em 1074 cm<sup>-1</sup> (C-C de carboidrato), 789 cm<sup>-1</sup>, 767 cm<sup>-1</sup> e 618 cm<sup>-1</sup> (estiramento de alcino).

**Figura 5.14:** Espectro FTIR do biocorante de *Penicillium chrysogenum*.

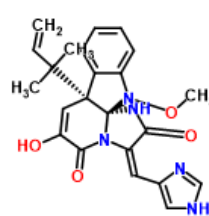
De acordo com Lopes (2013a,b), o fungo *Penicillium chrysogenum* IFL 1 produz como metabólitos secundários os compostos Chrysogine, Meleagrina e Roquefortina C (micotoxina) e Penicilina G (antibiótico) apresentados na Figura 5.15. Os estiramentos presentes no espectro do biocorante de *Penicillium chrysogenum* IFL 1 estão de acordo com os grupos funcionais destes compostos.

**Figura 5.15:** Metabólitos secundários formados pelo fungo *Penicillium chrysogenum*.

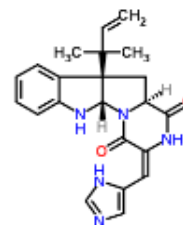
Penicilina G:  
C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>4</sub>S



Chrysogina:  
C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



Meleagrina:  
C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>

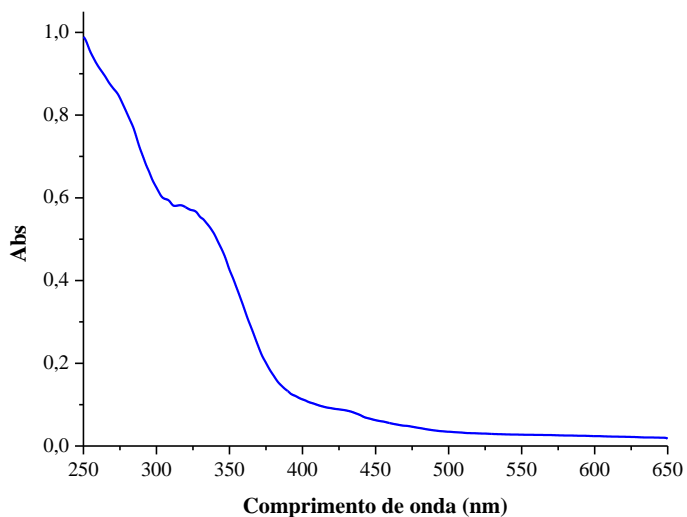


Roquefortina C:  
C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>

Fonte: Chemspider, 2018; Kumar *et al.*, 2018.

O biocorante produzido por *Penicillium chrysogenum* possui cor amarela intensa e a Figura 5.16 apresenta a curva de varredura característica. O biocorante tem maior absorção na região do UV e uma pequena banda no comprimento de onda de 440 nm.

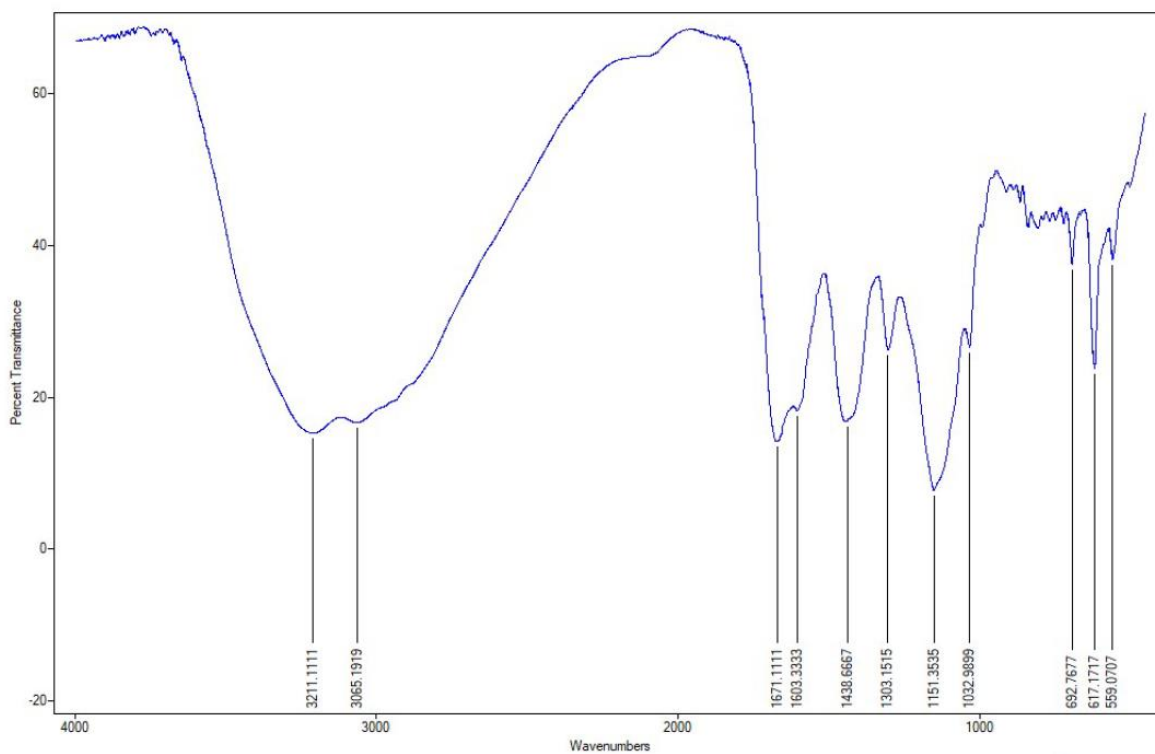
**Figura 5.16:** Espectro UV-visível do biocorante de *Penicillium chrysogenum*.



#### 5.1.4.6 Biocorante de *Penicillium vasconiae*

A Figura 5.17 apresenta o espectro FTIR do biocorante de *Penicillium vasconiae*.

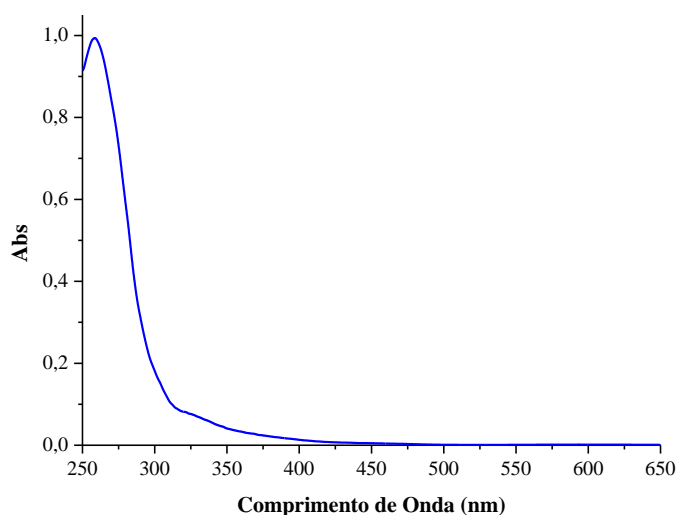
**Figura 5.17:** Espectro FTIR do biocorante de *Penicillium vasconiae*.



No espectro FTIR da amostra líquida de biocorante de *Penicillium vasconiae*, os principais estiramentos apresentados foram em  $3211\text{ cm}^{-1}$  referente banda de vibração da água,  $3065\text{ cm}^{-1}$  de insaturação C=C-H e /ou anel aromático,  $1671$  e  $1603\text{ cm}^{-1}$  de amidas primárias,  $1438\text{ cm}^{-1}$  de estiramento (C-N),  $1303\text{ cm}^{-1}$  de amida terciária e  $1151$  e  $1032\text{ cm}^{-1}$  de estiramentos de carboidratos (C-O e C-C, respectivamente).

O biocorante produzido por *Penicillium vasconiae* apresenta cor amarela pálida e a Figura 5.18 apresenta sua curva de varredura característica. O biocorante tem maior absorção na região do UV e não é perceptível banda de absorção na faixa visível.

**Figura 5.18:** Espectro UV-vis do biocorante de *Penicillium vasconiae*.



Segundo as Figuras 5.16 e 5.18, os fungos *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium vasconiae* produzem metabólitos majoritariamente na região do espectro UV, demonstrando não serem fontes propícia de biocorantes, dentre as cepas estudadas.

Contudo, os fungos *Aspergillus niger* IFL5, *Penicillium herguei* e *Monascus purpureus* NRRL1992 foram selecionados para continuidade do trabalho devido às tonalidades dos biocorantes formados e predominância de metabólitos secundários formados na região visível do espectro.

### 5.1.5 Caracterização da produção de biocorante por cultivo submerso

Os resultados de produção dos respectivos biocorantes por cultivo submerso em substrato batata dextrose estão apresentados e discutidos a seguir.

#### 5.1.5.1 Biocorante de *Monascus purpureus* NRRL1992

A Tabela 5.3 apresenta os dados de produção biocorante extracelular por cultivo submerso de *Monascus purpureus* em substrato de batata dextrose.

**Tabela 5.3:** Produção de biocorante extracelular por cultivo submerso de *Monascus purpureus*.

Dias de cultivo	Vermelho		Amarelo	
	Absorção a 490 nm	Produtividade (Abs/dia)	Absorção a 420 nm	Produtividade (Abs/dia)
0	-	-	-	-
3	0,18±0,0021	0,058±0,00071	0,15±0,0017	0,052±0,00056
5	0,53±0,0064	0,10±0,0013	0,46±0,0050	0,093±0,0010
7	0,78±0,0095	0,11±0,0014	0,52±0,0087	0,074±0,0012
9	0,95±0,0046	0,10±0,00051	0,71±0,010	0,079±0,0011
12	0,97±0,0015	0,081±0,00013	0,74±0,0011	0,061±0,000088
16	0,97±0,0025	0,061±0,00016	0,75±0,0029	0,047±0,00018
19	0,97±0,0022	0,051±0,00012	0,75±0,00088	0,040±0,000047
21	0,99±0,0076	0,047±0,00036	0,76±0,0033	0,036±0,00016

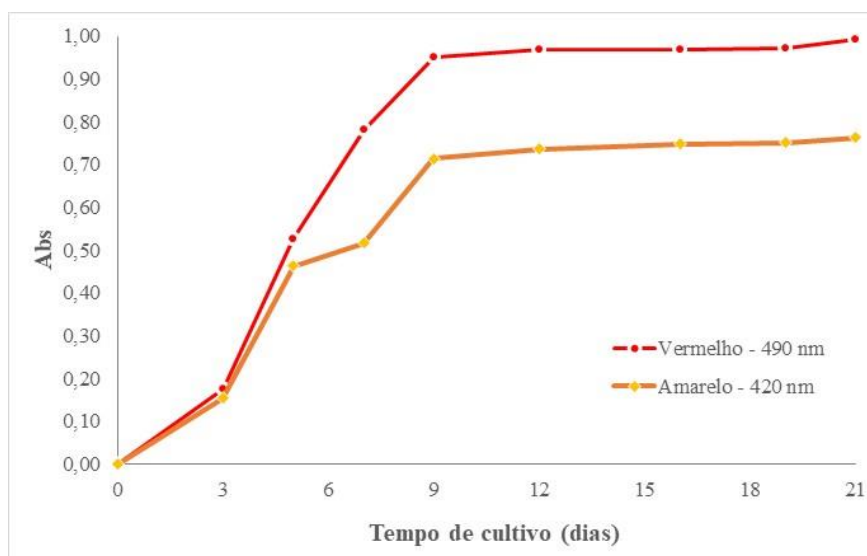
Nas condições descritas, verificou-se a maior produção de biocorante entre o terceiro e o nono dia, estabilizando no décimo segundo dia com baixo incremento após esse período. A produção da cor vermelha e amarela seguem a mesma tendência, com predomínio da primeira.

Nos estudos de Lopes (2011), no cultivo submerso de *M. purpureus* NRRL1992 a fase estacionária é atingida ao final do sétimo dia, fase na qual são produzidos os metabólitos secundários. Nos estudos de Srianta *et al.* (2016) com cultivo em estado sólido de *M. purpureus*, a produção de biocorantes iniciou no quarto dia, final da fase logarítmica, utilizando arroz como substrato e estabilizando a produção após o 12º dia. Com uso de outros cereais testados como



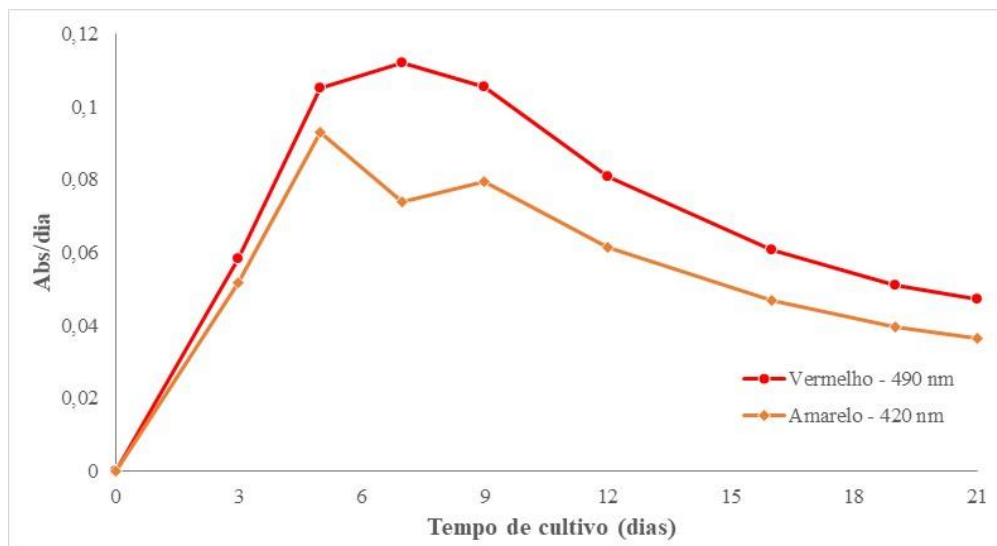
substrato foram requeridos períodos mais longos de cultivo e a produção de biocorantes foi menor. Nos estudos de Chatterjee *et al.* (2009), o início da produção de pigmento foi evidenciado do terceiro dia e maior rendimento no décimo dia. Além disso, o crescimento aumentou com o tempo e atingiu seu máximo no 6º dia. A Figura 5.19 ilustra a produção de biocorante para os comprimentos de onda de 420 e 490 nm.

**Figura 5.19:** Produção biocorante extracelular por cultivo submerso de *M. purpureus*.



A produtividade de formação do biocorante está apresentada na Figura 5.20 e observa-se que a maior produtividade para formação de biocorante vermelho é do quinto ao sétimo dia.

**Figura 5.20:** Produtividade de biocorante extracelular por cultivo submerso de *M. purpureus*.



### 5.1.5.2 Biocorante de *Aspergillus niger* IFL5

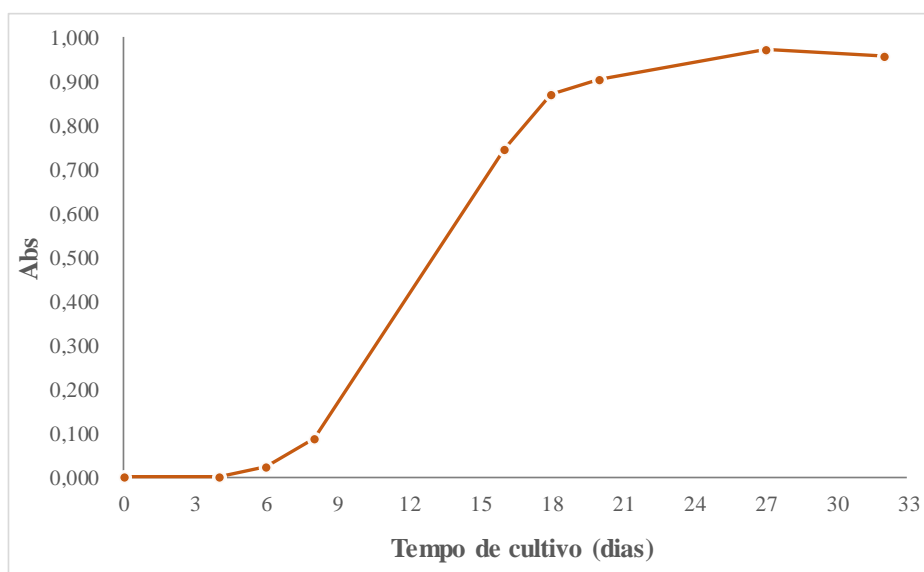
A Tabela 5.4 apresenta a produção de biocorante por cultivo submerso de *A. niger*.

**Tabela 5.4:** Produção de biocorante extracelular por cultivo submerso de *A. niger*.

Dias de cultivo	Biocorante marrom	
	Absorção 420 nm	Produtividade (Abs/dia)
0	-	-
4	-	-
6	0,024±0,0039	0,0040±0,00065
8	0,088±0,0011	0,011±0,00013
16	0,75±0,0011	0,047±0,000066
18	0,87±0,0053	0,048±0,00029
20	0,90±0,0011	0,045±0,000053
27	0,97±0,0035	0,036±0,00013
32	0,96±0,0028	0,030±0,000088

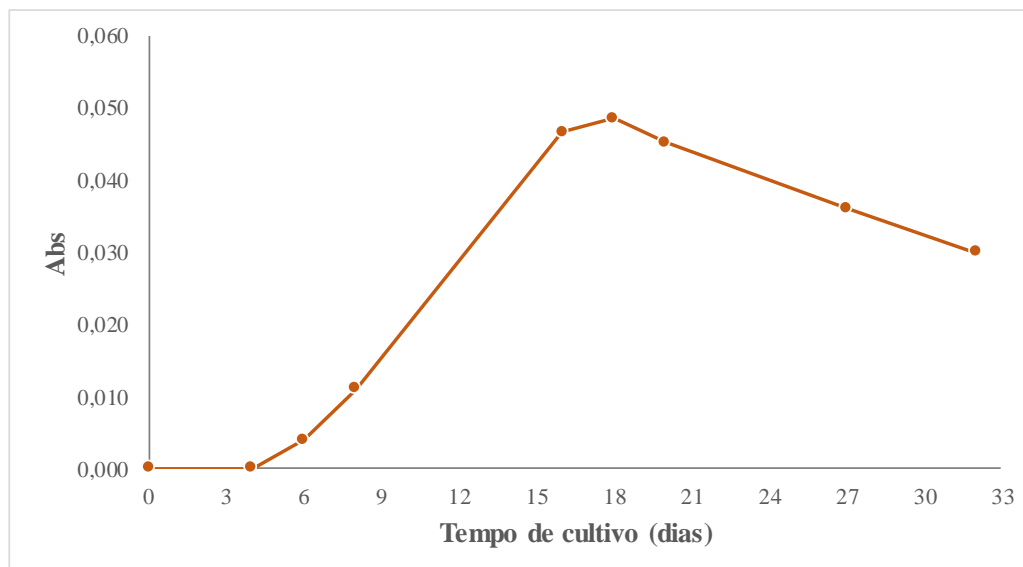
Nas condições de cultivo descritas, a maior produção de corante ocorre até vigésimo sétimo dia e após entra em decréscimo. A Figura 5.21 ilustra a produção de biocorante.

**Figura 5.21:** Produção biocorante extracelular por cultivo submerso de *A. niger*.



A produtividade de formação do biocorante de *A. niger* está descrita na Figura 5.22. e a maior produtividade para formação deste biocorante ocorre no décimo oitavo dia.

**Figura 5.22:** Produtividade de biocorante extracelular por cultivo submerso de *A. niger*.



### 5.1.5.3 Biocorante de *Penicillium herguei*

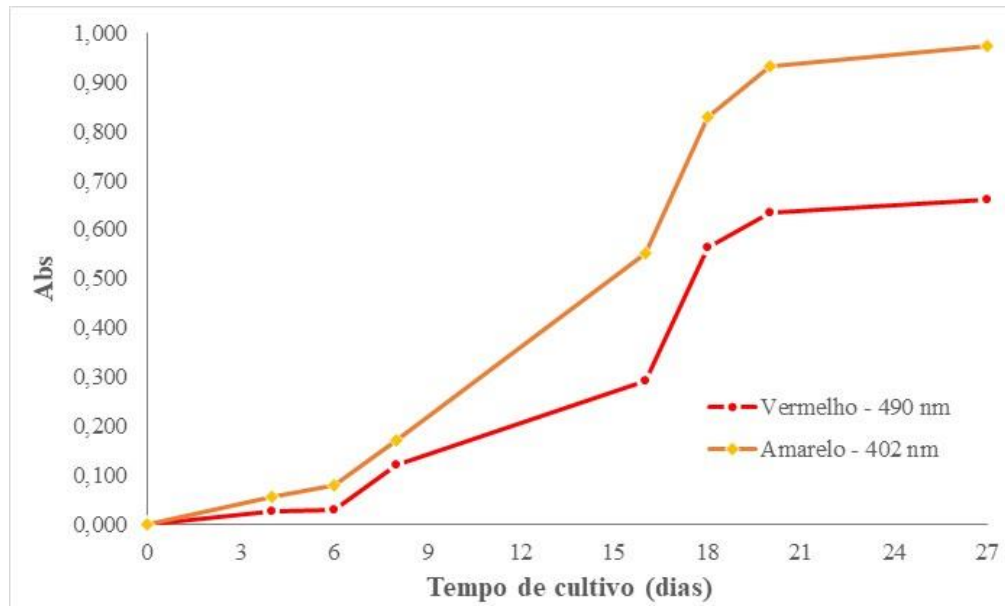
A Tabela 5.5 apresenta a produção biocorante extracelular por cultivo submerso de *Penicillium herguei*. Nas condições de cultivo descritas, a maior produção de corante ocorre até vigésimo dia.

**Tabela 5.5:** Produção de biocorante extracelular por cultivo submerso de *P. herguei*.

Dias de cultivo	Vermelho		Amarelo	
	Absorção a 490 nm	Produtividade (Abs/dia)	Absorção a 420 nm	Produtividade (Abs/dia)
0	-	-	-	-
4	0,053±0,0015	0,013±0,00039	0,056±0,0023	0,014±0,00058
8	0,12±0,0026	0,015±0,00033	0,17±0,0037	0,021±0,00046
16	0,29±0,0024	0,018±0,00015	0,55±0,0024	0,035±0,00015
18	0,56±0,012	0,031±0,00067	0,83±0,018	0,046±0,00099
20	0,63±0,014	0,032±0,00068	0,93±0,020	0,047±0,0010
27	0,66±0,014	0,025±0,00053	0,98±0,021	0,036±0,00078

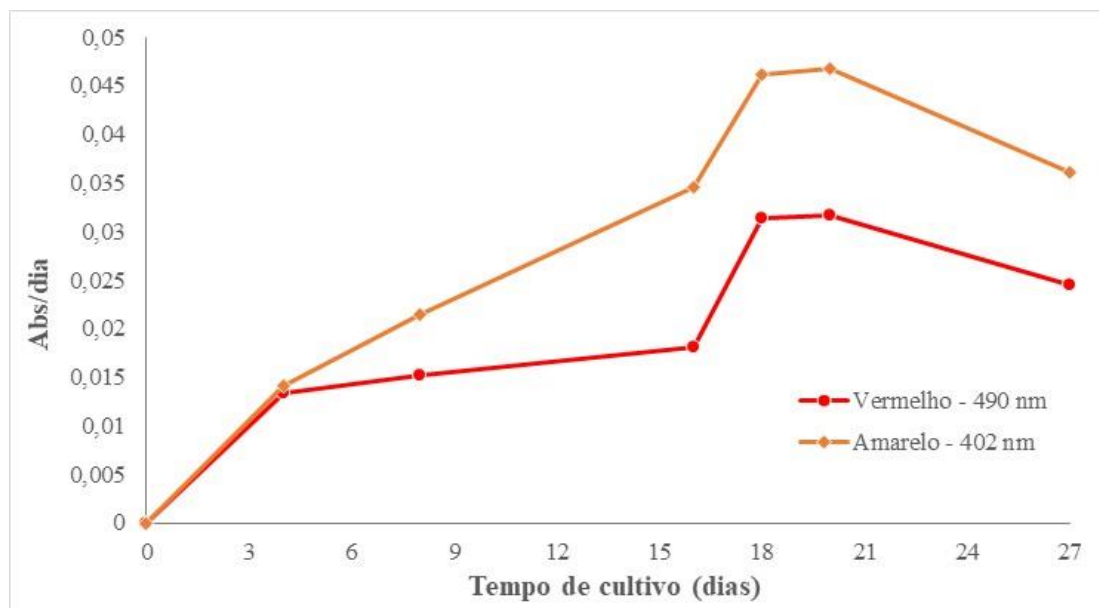
A Figura 5.23 ilustra a produção de biocorante. A produção da cor vermelha e amarela seguem tendência similar, com predomínio da segunda.

**Figura 5.23:** Produção biocorante extracelular por cultivo submerso de *P. herguei*.



A produtividade de formação do biocorante de *Penicillium herguei* está demonstrada na Figura 5.24, onde se verifica que a maior produtividade para formação deste biocorante é no décimo oitavo dia.

**Figura 5.24:** Produtividade de biocorante extracelular por cultivo submerso de *P. herguei*.



A produção de biomassa nos cultivos submersos dos fungos *Aspergillus niger*, *Monascus purpureus* e *Penicillium herguei* está colocada na Tabela 5.6, sendo que o *Monascus purpureus* apresentou maior produção de biomassa em menor tempo de cultivo, seguido por *A. niger* e *P. herguei*.

**Tabela 5.6:** Produção de biomassa por cultivo submerso de *A. niger*, *M. purpureus* e *P. herguei*.

Fungo	Produção máxima (g)	Tempo de Cultivo (h)	Produtividade		
			(g biomassa/g substrato)	(mg biomassa/ h cultivo)	(mg biomassa/ mL meio de cultivo)
<i>A. niger</i>	0,15±0,015	648	0,16	0,24	3,8
<i>M. purpureus</i>	0,43±0,048	216	0,45	1,9	11
<i>P. herguei</i>	0,073±0,0024	480	0,076	0,15	1,8

## 5.2 Tingimento de couro com biocorante de *M. purpureus*

Inicialmente, os biocorantes concentrados dos fungos *Aspergillus niger* IFL5, *Penicillium chrysogenum* IFL1, *Penicillium herguei*, *Penicillium vasconiae* IFL4 e *Monascus purpureus* NRRL1992 foram aplicados no tingimento em concentração de 2%, sem adição de água. No entanto, em função da tonalidade azulada do couro *wet-blue*, as cores conferidas pelos quatro primeiros biocorantes foram pouco perceptíveis nas amostras tingidas. Já o biocorante de *Monascus purpureus* alterou o aspecto visual do couro tingido para a coloração característica do extrato, apresentando viabilidade para uso no tingimento.

### 5.2.1 Testes de formulação de tingimento em escala bancada

O biocorante de *Monascus purpureus* foi escolhido para a continuidade do trabalho de desenvolvimento de tingimento de couro devido à produtividade e aspecto visual conferido ao couro. Além disso, este biocorante tem sido amplamente utilizado de forma segura em alimentos.

Nesta etapa estão descritos os resultados das condições de tingimento estudadas em escala de bancada com uma adição de biocorante à temperatura ambiente. Posteriormente foi realizado o tingimento com uma segunda adição de corante à 50 °C (remonte).

Os resultados de esgotamento de biocorante do banho devido à absorção de corante pelo couro no tingimento, variando o pH de desacidulação e utilizando ácido fórmico na fixação estão apresentados na Tabela 5.7.

**Tabela 5.7:** Valores de absorbância dos banhos e absorção de biocorante pelo couro para as condições de pH de desacidulação testadas.

pH de desacidulação	Absorbância do banho de tingimento		Absorção pelo couro (%)
	Inicial	Final	
4,0	2,38±0,0240	0,655±0,0262	72,5±1,09
5,0	2,38±0,0240	0,676±0,0304	71,6±1,27
6,0	2,38±0,0240	1,02±0,0226	57,2±0,940

O maior aproveitamento do biocorante de *Monascus purpureus* do banho, indicativo da reação do biocorante com o couro, foi igual para os pH de desacidulação ajustados em pH 4,0 (72,5±1,09) % e pH 5,0 (71,6±1,27) %, mas diminuiu em pH 6,0 para (57,2±0,940) %.

O pH 5 foi considerado melhor valor de desacidulação para utilização na formulação de tingimento, pois essa condição favorece a etapa posterior de engraxe, produzindo couros mais macios do que em relação ao pH 4 (Fuck *et al.*, 2011), e está de acordo com os estudos de Velmurugan (2010a).

Para pH de desacidulação ajustado em 5,0, os resultados de esgotamento de biocorante do banho de tingimento variando o tipo de ácido utilizado na fixação estão na Tabela 5.8.

**Tabela 5.8:** Valores de absorbância dos banhos e absorção de biocorante pelo couro com relação ao tipo de ácido usado na fixação.

Ácido utilizado na fixação do corante	Absorbância do banho de tingimento		Absorção pelo couro (%)
	Inicial	Final	
Ácido Fórmico	2,38±0,0240	0,676±0,0304	71,6±1,27
Ácido Cítrico	2,38±0,0240	0,840±0,0297	64,7±1,24

A fixação com ácido fórmico proporcionou maior esgotamento do banho ( $71,6 \pm 1,27$ ) % em relação à fixação com ácido cítrico ( $64,7 \pm 1,24$ ) %.

Os resultados de esgotamento de biocorante do banho de tingimento com relação ao uso de auxiliar de tingimento está apresentada na Tabela 5.9 para pH 5,0 e uso de ácido fórmico na fixação. A absorção do biocorante no couro com o uso de auxiliar de tingimento foi de ( $71,6 \pm 1,27$ ) %, enquanto que sem auxiliar foi de ( $67,4 \pm 1,18$ ) %. O uso de auxiliares de tingimento aumentou a absorção do biocorante e também melhorou a homogeneização da cor da superfície do couro verificada visualmente.

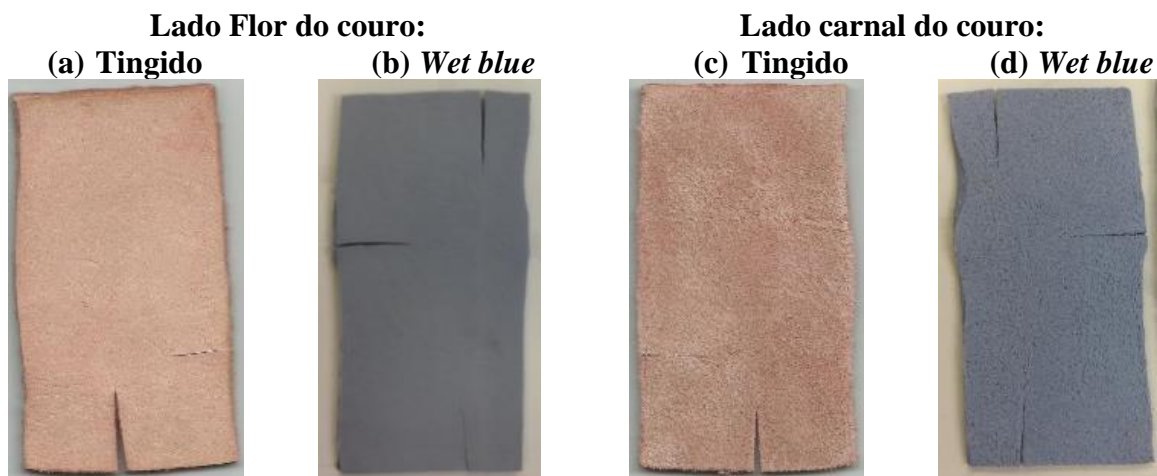
**Tabela 5.9:** Valores de absorbância dos banhos e absorção de biocorante pelo couro com relação ao uso de auxiliar de tingimento.

Uso de auxiliar de tingimento	Absorbância do banho de tingimento		Absorção pelo couro (%)
	Inicial	Final	
Sim	$2,38 \pm 0,0240$	$0,676 \pm 0,0304$	$71,6 \pm 1,27$
Não	$2,38 \pm 0,0240$	$0,776 \pm 0,0283$	$67,4 \pm 1,18$

Logo, a melhor condição adotada para tingimento de couro, que resultou em absorção de 72% de corante, foi com uma etapa de adição de biocorante de *M. purpureus* a temperatura ambiente, com ajuste de pH de desacidulação em 5,0, com fixação com ácido fórmico e com uso de auxiliar de tingimento.

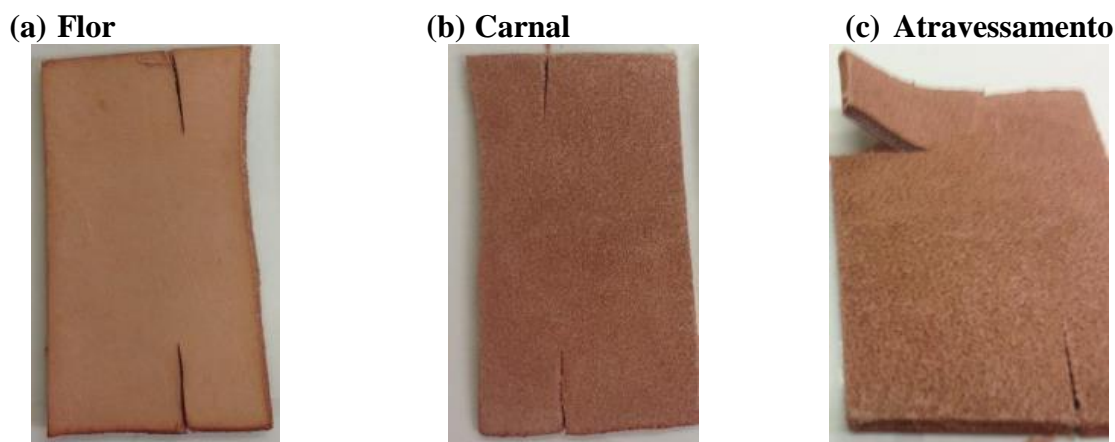
O tingimento com uma etapa de adição de biocorante *M. purpureus* conferiu a coloração característica ao couro de forma homogênea nos lados flor (A) e (C) carnal (Figura 5.25).

**Figura 5.25:** Amostra de couro tingido em escala de bancada com uma etapa de adição de biocorante extraído de *Monascus purpureus*.



Posteriormente foi realizado tingimento em amostra de couro com duas adições de biocorante de *Monascus purpureus*, sendo a primeira a temperatura ambiente e a segunda a 50°C, com uso de auxiliar de tingimento e com pH de desacidulação ajustado a 5,0 e com ácido fórmico para fixação, cuja amostra está na Figura 5.26. O tingimento conferiu cor superficial do couro com tonalidade mais intensa do que com apenas uma adição, devido à maior oferta de corante e aumento de temperatura do processo. O atravessamento na seção transversal do biocorante no couro foi satisfatório, mas não foi completo. Em geral, na industrialização de couros são realizados tingimentos com duas etapas de adição de corantes (comerciais) e em maiores concentrações para obtenção de atravessamento completo (Clariant, 2014; Basf, 2007; TFL, 2004).

**Figura 5.26:** Amostra de couro tingido em escala de bancada com duas etapas de adição de biocorante extraído de *Monascus purpureus*.

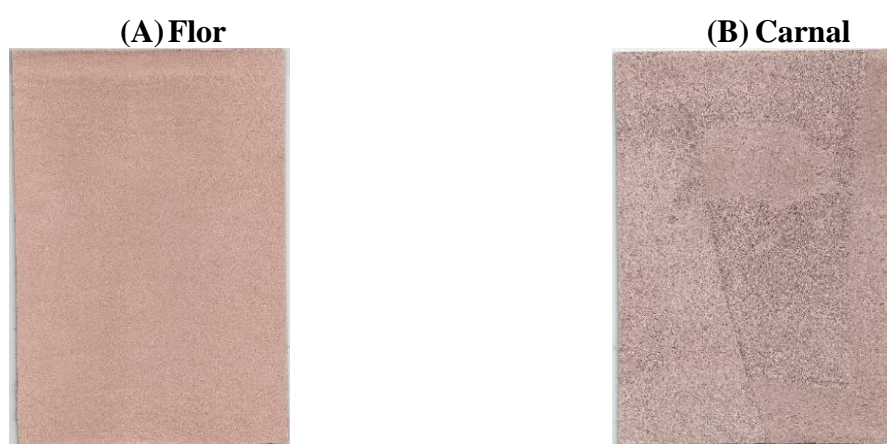




### 5.2.2 Testes da formulação de tingimento em escala piloto

Neste item estão apresentados os resultados de tingimento em escala piloto de couro *wet-blue* de aproximadamente (40 x 40) cm<sup>2</sup> com biocorante *Monascus purpureus* segundo as condições estabelecidas no item 5.2.1. A amostra de couro tingida com uma etapa de adição de biocorante *Monascus purpureus* a temperatura ambiente, com uso de auxiliar de tingimento e com pH de desacidulação ajustado a 5,0 com ácido fórmico está apresentada na Figura 5.27. Os couros tingidos foram secos, estirados conforme processo e condições industrial usual.

**Figura 5.27:** Amostra de couro tingido em escala piloto com uma etapa de adição de biocorante extraído de *Monascus purpureus*.



Os resultados de esgotamento do banho e de Lovbond no tingimento piloto estão apresentados na Tabela 5.10. De acordo com a técnica de leitura de cor Lovbond (vermelhos/amarelo), o extrato colorido de *Monascus purpureus* apresentou cor inicial de 62,0/20,0 e o banho final de tingimento final foi 4,3/6,3. O percentual de exaustão de biocorante do banho de tingimento foi de 94,80%, superior aos resultados encontrados em escala de bancada, devido ao maior efeito mecânico do fulão utilizado.

**Tabela 5.10:** Testes para determinação de cor do banho de tingimento.

Testes para determinação de cor do banho de tingimento	Inicial	Final	Absorção pelo couro (%)
Lovbond (cor vermelho / amarelo)	62,0/20,0	4,3/6,3	-
Absorbância do banho de tingimento	0,635	0,033	94,80

### 5.2.3 Determinação da resistência da cor nas amostras tingidas

Nesta etapa estão descritos os resultados das determinações em escala de cinzas e colorimétrica das resistências de cor das amostras tingidas em escala piloto ou bancada com biocorante *Monascus purpureus*. Na Tabela 5.11 são apresentados os resultados em escala de cinzas das amostras dos couros tingidas em escala de bancada submetidas aos testes de resistência da cor à luz UV, ao calor e à migração em PVC plastificado, variando o ácido de fixação.

**Tabela 5.11:** Determinações em escala de cinzas de resistência da cor do couro à luz UV, calor e migração a PVC de tingimento em escala de bancada.

Amostra	Luz UV	Térmica	Migração da cor em PVC
Fixação com ácido fórmico	1	4	3/4
Fixação com ácido cítrico	1	4/5	4

As amostras de couro tingidas e desaciduladas com ácido fórmico obtiveram estabilidade térmica grau 4 e solidez à migração para PVC plastificado grau 3/4, enquanto que os couros tingidos e desacidulados com ácido cítrico obtiveram classificações superiores 4 e 4/5, respectivamente, de acordo com os valores da escala de cinza. A resistência à luz UV foi grau 1 em ambas condições. Assim, pode se afirmar que o uso do ácido cítrico influenciou positivamente a resistência da cor do couro tingido ao calor e na migração em PVC, mas manteve a mesma classificação quanto à luz UV. O ácido cítrico usado como mordente em tingimento do couro com corantes naturais melhora a solidez da cor e a absorção de corante, comparativamente ao tingimento sem aplicação de mordentes, porém o ácido oxálico é o mais indicado (Inayat *et al.*, 2010) e é uma alternativa ecológica ao processo de tingimento natural com mordente metálico (Vankar *et al.*, 2007).

Os couros tingidos em escala piloto foram expostos à ação térmica e luz UV, conforme resultados apresentados na Tabela 5.12. Observa-se para o couro tingido que quanto maior foi a temperatura de exposição, maior foi o clareamento do couro, detectado pela luminosidade ( $L^*$ ), e menores foram os parâmetros  $a^*$  (amarelo) e  $b^*$  (vermelho), devido à degradação da cor.

A amostra quando exposta à ação dessas fontes tende a retornar ao aspecto visual predominante do couro *wet-blue* que possui tonalidade azulada, sendo mais evidente sob a ação de luz UV, mesmo em menor tempo de exposição.

**Tabela 5.12:** Determinações colorimétricas de resistência térmica e ultravioleta do couro tingido com *Monascus purpureus* em escala piloto com uma adição de corante.

Parâmetros	Padrões		Tratamentos no couro tingido		
	Couro <i>Wet-blue</i>	Couro tingido	50°C por 120 h	100°C por 120h	UV light por 24h
L*	83,92±0,04	71,98±0,09	72,21±0,04	74,59±0,19	77,04±0,30
a*	0,37±0,03	13,22±0,46	9,57±0,11	8,85±0,08	5,13±0,02
b*	2,67±0,04	15,38±0,07	13,46±0,04	12,84±0,03	16,06±0,08
C	2,70±0,04	20,29±0,34	16,51±0,10	15,54±0,08	16,86±0,07
H	82,02±0,02	49,33±0,89	54,58±0,23	55,72±0,51	72,30±0,14
DE	-	-	3,56±0,11	4,30±0,20	11,34±0,08

Luminosidade (L\*): zero (preto) a 100 (branco); verde (-a\*) a vermelho (+ a\*); azul (-b\*) a amarelo (+ b\*); croma (C\*): saturação ou pureza de cor; matiz (h): grau de vermelhidão, amarelecimento, verde e azul (0, 90, 180 e 270); DE: Variação de cor.

#### 5.2.4 Determinação da presença de fungo nos couros tingidos

Nesta etapa estão descritos os resultados das determinações da presença de fungo em amostras tingidas com biocorante de *M. purpureus* e com corante Melioderm HF vermelho G da Clariant, com finalidade de verificar se o corante natural teve influência na contaminação do produto. Ambos corpos de prova foram tingidos a partir de pedaços do mesmo couro *wet-blue*, não possuem microbicidas e foram tratados e acondicionadas da mesma maneira.

Os couros foram moídos, misturados com substrato ágar batata dextrose e cultivados em placas de petri por 10 dias à 30°C. As culturas de microrganismos que cresceram foram transferidas separadamente em novos substratos até serem isoladas. O resultado da contagem de células de microrganismos por grama de couro está colocado na Tabela 5.13. Ambas amostras apresentaram alta contaminação por fungos segundo o critério de avaliação. Esse

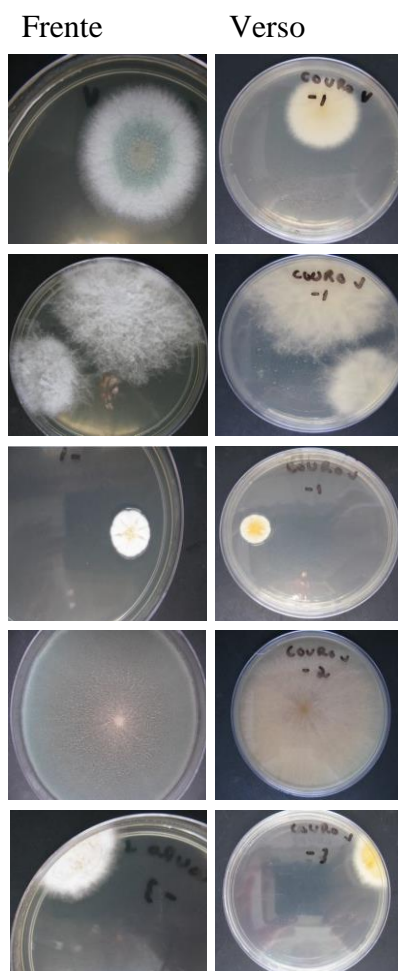
resultado já era esperado, pois elas não foram tratadas com microbicidas e tal contaminação é devido à manipulação e exposição do couro ao ambiente.

**Tabela 5.13:** Contagem do número de fungos por grama de couros tingidos.

Amostra	Números de células de fungos por grama de material (UFC/g)	Avaliação
Couro tingido com corante comercial Melioderm HF	$1,3 \times 10^3$	Alta contaminação
Couro tingido com biocorante de <i>Monascus purpureus</i>	$1,5 \times 10^3$	Alta contaminação

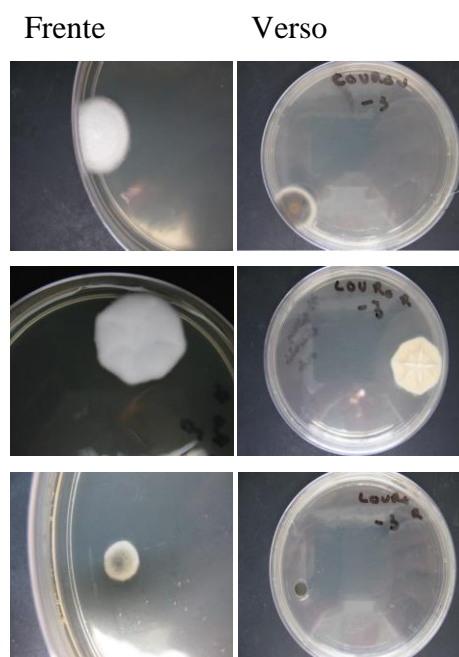
A Figura 5.28 mostra os lados frente e verso das culturas de microrganismos encontradas nos couros tingidos com biocorante de *Monascus purpureus*.

**Figura 5.28:** Culturas encontrada no couro tingido com biocorante de *Monascus purpureus*.



As amostras analisadas de couro tingido com biocorante não apresentaram contaminação por *Monascus purpureus*, mesmo quando cultivadas por 10 dias à 30°C em placas de Petri com meio de cultura Ágar Batata Dextrose. O resultado era esperado, pois o biocorante foi centrifugado e filtrado com membrana de 0,22 µm para retenção dos esporos. A Figura 5.29 mostra os lados frente e reverso das culturas encontradas nos couros tingidos com o corante comercial.

**Figura 5.29:** Culturas encontradas no couro tingido com corante comercial.



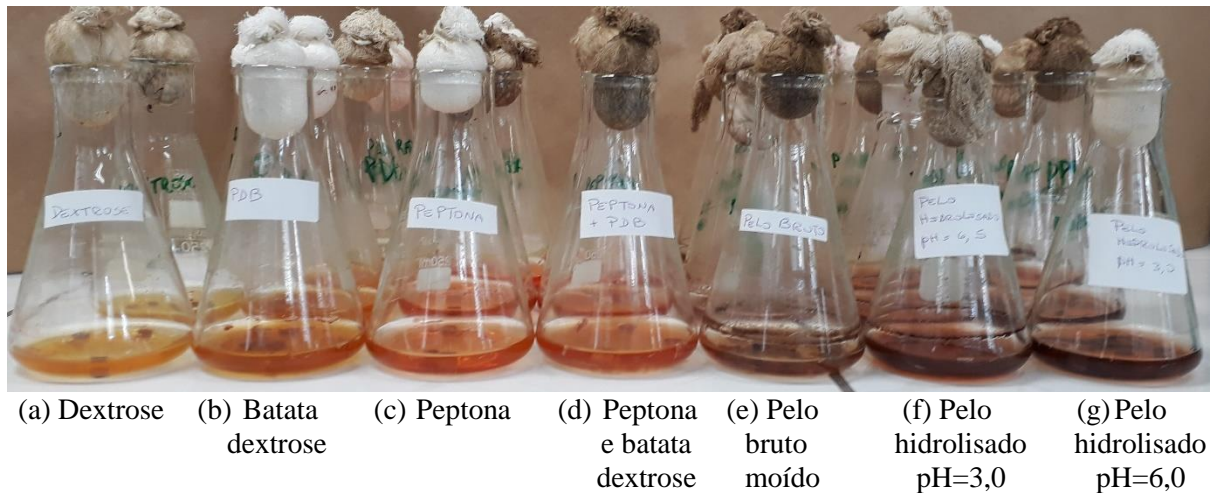
Observa-se que o couro tingido com corante comercial apresentou contaminação de microrganismos na mesma ordem de grandeza e foram encontradas culturas de microrganismos de forma similar tanto nos couros tingidos com o biocorante quanto nas amostras tingidas com corante comercial.

### 5.3 Utilização de pelo hidrolisado como meio de cultura

Nesta parte são apresentados os resultados da utilização de resíduo de pelo bovino obtido do processo industrial de depilação de pele como substrato para produção de biocorante de *Monascus purpureus* por cultivo submerso, em comparação com produtos comerciais normalmente utilizados como meio de cultura de fungos filamentosos.

A Figura 5.30 apresenta os cultivos submersos realizados com *Monascus purpureus* em substratos comerciais de (a) Dextrose, (b) batata dextrose, (c) Peptona, comparativamente com (e) Pelo bruto moído, (f) Pelo hidrolisado e ajustado em pH 3,0 e (g) Pelo hidrolisado e ajustado em pH 6,0, nas concentrações de 5g/L.

**Figura 5.30:** Cultivo submerso de *Monascus purpureus* com o substrato de pelo hidrolisado, comparativamente com meios comerciais.



Os extratos dos cultivos submerso de *Monascus purpureus* com os meios de cultura testados apresentaram diferentes tonalidades de cor devido ao pH do meio, conforme já evidenciado em estudos anteriores.

Este fungo produz diferentes cores em cultivo submerso dependendo do pH do meio (Srianta *et al.*, 2016), predominando amarelo a  $\lambda_{\max}$  400 nm em pH inicial baixo (2,0 - 4,0) e diminuindo acentuadamente acima de pH 5, laranja a  $\lambda_{\max}$  480 nm se mantém em estado estacionário independentemente da condição de pH e vermelho a  $\lambda_{\max}$  500 nm em pH mais alto (6,0 - 8,0) (Chatterjee *et al.*, 2009).

O ponto isoelétrico das fontes  $\text{NH}_3^+$  é crítico para converter o pigmento laranja em vermelho Vendruscolo *et al.*, 2016b). Fontes de nitrogênio como aminoácidos exercem regulação complexa sobre a expressão gênica e atividades enzimáticas para síntese de policetídeos, sendo que os pigmentos permanecem essencialmente intracelulares devido à sua alta hidrofobicidade e excretados no meio após a reação com uma unidade  $\text{NH}_2$  de aminoácidos (Hajjaj *et al.*, 2012). O biocorante formado reage com o íon amônio ou grupos amino livres

para transformar em derivados de amina vermelha em condição neutra a básica (Chatterjee *et al.* 2009).

Os resultados de produção de biocorante e biomassa por cultivo submerso, realizados em triplicata, de *M. purpureus* com os substratos testados estão colocados na Tabela 5.14.

**Tabela 5.14:** Rendimento de biocorante e biomassa nos cultivos submersos de *Monascus purpureus* com os substratos testados.

Substrato	pH		Rendimento de biocorante		Rendimento de biomassa
	Inicial	Final	UA420/ g <sub>substrato</sub>	UA490 / g <sub>substrato</sub>	g Biomassa / g <sub>substrato</sub>
Pelo hidrolisado pH 6,5	6,27	7,77	1,252±0,014	1,670±0,031	0,1580±0,0009
Pelo hidrolisado pH 3,0	3,08	7,09	0,993±0,015	1,578±0,044	0,2413±0,0002
Pelo Bruto	5,00	7,97	0,545±0,022	0,880±0,011	0,0647±0,0026
Batata Dextrose (PDB)	5,16	5,18	1,170±0,005	1,093±0,002	0,3658±0,0097
Peptona	6,72	7,97	1,733±0,017	2,944±0,062	0,1737±0,0051
Peptona + Batata dextrose	5,95	7,72	1,357±0,025	2,513±0,049	0,3353±0,0032
Dextrose	5,41	5,63	1,195±0,028	0,883±0,011	0,1592±0,0013

A peptona comercial demonstrou ser o melhor meio de cultura para cultivo submerso de *Monascus purpureus* NRRL1992, dentre os substratos utilizados para produção de biomassa e biocorante (Lopes *et al.*, 2013a) e enzimas  $\beta$ -glicosídeos (Daroit *et al.*, 2007). O pelo hidrolisado com pH 6,5 demonstrou ser melhor meio de cultivo para produção de biocorante do que a Dextrose e Batata Dextrose por ser fonte tanto de carbono, quanto de nitrogênio. A combinação de peptona e batata dextrose como substrato diminui a produção de biomassa e corante em relação à composição do meio somente com peptona.

O uso do pelo hidrolisado como meio de cultura em cultivo submerso de *Monascus purpureus* aumentou a produção de biocorante em comparação com o pelo bruto moído, demonstrando que a hidrólise ácida contribui significativamente para o desenvolvimento desse substrato como macronutriente fúngico. O ajuste a pH 6,5 do pelo hidrolisado aumentou a

produção de biocorante em relação ao de pH 3,0, sendo que com ambos os extratos finais ficaram com pH acima de 7,0.

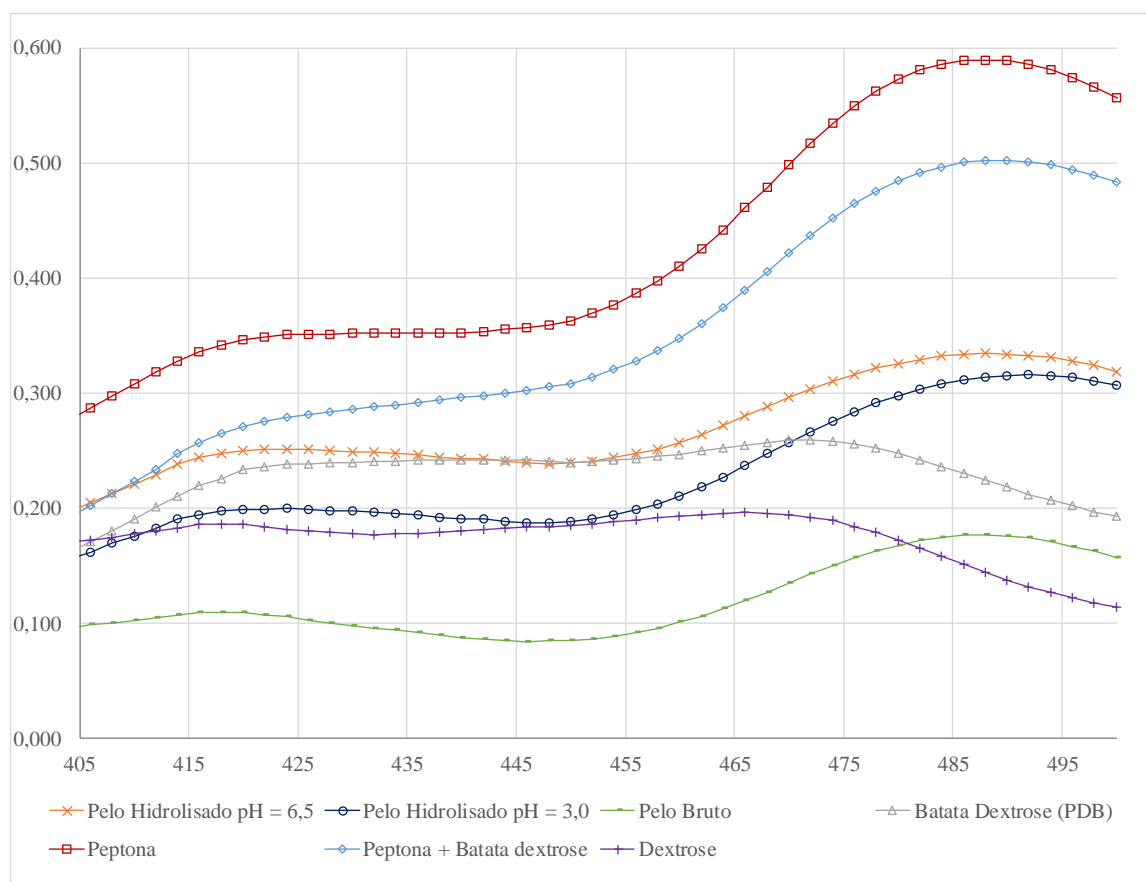
A hidrólise ácida do resíduo de pelo bovino com uso de HCl 6 N por 24 h a 60 °C e posterior ajuste de pH a 6,5 com NaOH 6 N demonstrou ser um procedimento simples e eficiente para preparação de meio de cultura, mas pode ser melhorado com adição de micronutrientes para atingir resultados mais próximos ao da peptona. O desenvolvimento de pelo hidrolisado como meio de cultura para uso microbiológico é uma promissora oportunidade de valorização de subproduto da indústria coureira e consequente redução de resíduo gerado para destinação. Ainda, é potencial alternativa para redução do custo de produção de biocorante, pois o meio de cultura pode representar até 73% do custo total de produção (Panesar *et al.*, 2015), principalmente as fontes de carbono e nitrogênio (Srivastav *et al.*, 2015; Taskin *et al.*, 2011).

Taskin *et al.* (2011) propuseram um procedimento de hidrólise ácida de pena de galinha com HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, nas concentrações 6 N, primeiramente sob aquecimento a 70°C por 24 h e posteriormente com aquecimento a 130°C por 4 h. Por fim, foram misturados, filtrados, neutralizados com KOH, Mg(OH)<sub>2</sub> e NaOH e concentrados por evaporação. Segundo os autores tal procedimento demonstrou ser mais efetivo para o cultivo microbiológico do que a hidrólise apenas com HCl ou ácido propiônico (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) e ácido fórmico (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) devido à incorporação dos oligoelementos fósforo (P) e enxofre (S) no substrato. O fósforo participa da estrutura dos ácidos nucleicos, fosfolipídios, ATP, muitos cofatores e algumas proteínas e o enxofre é necessário para a síntese dos aminoácidos cisteína e metionina, as vitaminas tiamina e biotina, e alguns carboidratos. Da mesma forma, diferentes substâncias alcalinas usadas na neutralização como NaOH, KOH, Mg(OH)<sub>2</sub> e Ca(OH)<sub>2</sub> fornecem elementos Na, K, Mg e Ca. Haque *et al.* (2016), estudaram a utilização de hidrolisado de resíduos de panificação decorrente de reações hidrolíticas por *Aspergillus awamori* e *Aspergillus oryzae* como substrato, fonte de açúcares e aminoácidos, em cultivo submerso de *Monascus purpureus* para a produção de biocorantes, sendo obtido o maior rendimento de pigmento (24 UA/g) com o hidrolisado contendo 5 g/L de glicose inicial.



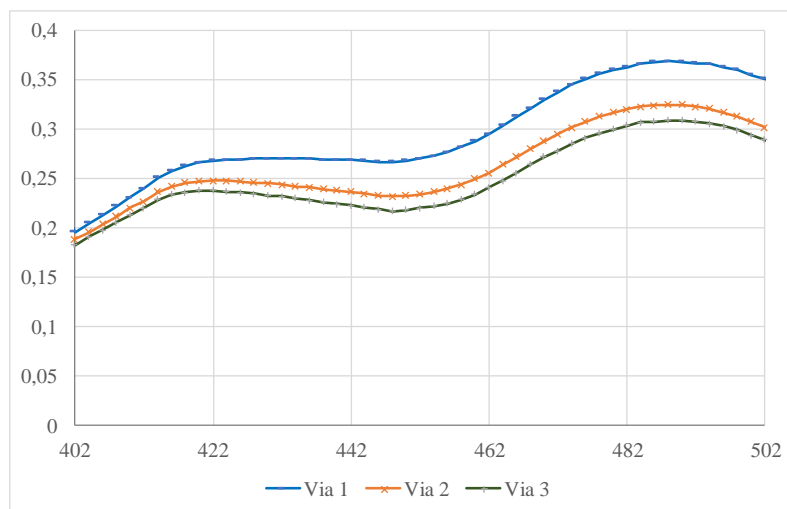
A Figura 5.31 apresenta a média dos espectros UV-vis do biocorante de *Monascus purpureus* cultivado com os diferentes meios de cultura. A utilização da dextrose apresentou tendência similar ao uso de batata dextrose como meio de cultura no cultivo submerso de *Monascus purpureus*, resultando em menor produção de biocorante na concentração padronizada de 5 g/L e, segundo estudos de Chatterjee *et al.* (2009), a concentração ideal de glicose para produção de pigmento vermelho é de 20 g/L.

**Figura 5.31:** Comparativo dos espectros UV-vis do biocorante de *Monascus purpureus* cultivado com os diferentes meios de cultura.



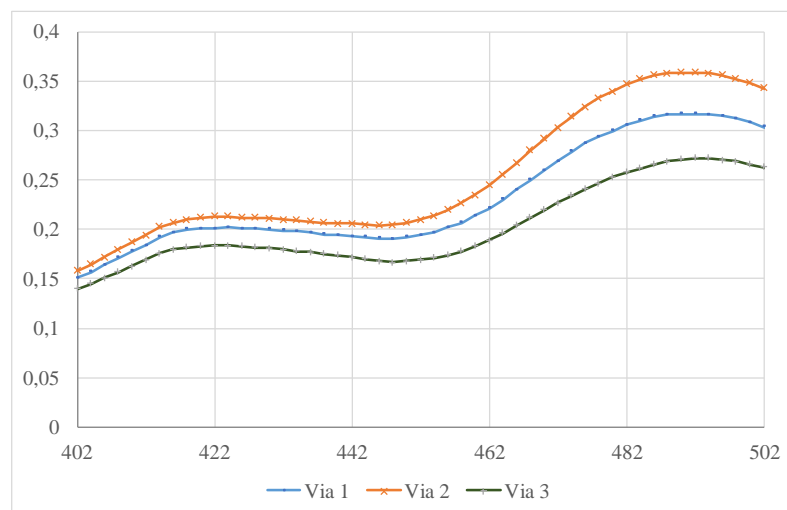
A Figura 5.32 apresenta as três vias do espectro UV-vis do biocorante de *Monascus purpureus* cultivado em solução aquosa de pelo hidrolisado a pH 6,5 como meio de cultura. O rendimento de produção de biocorante para as cores amarelo e vermelho foram, respectivamente,  $(1,252 \pm 0,014)$  UA/g de substrato e  $(1,670 \pm 0,031)$  UA/g de substrato.

**Figura 5.32:** Espectro UV-vis do biocorante de *Monascus purpureus* cultivado em solução aquosa de pelo hidrolisado a pH 6,5 como meio de cultura.



A Figura 5.33 apresenta as três vias do espectro UV-vis do biocorante de *Monascus purpureus* cultivado em solução aquosa de pelo hidrolisado a pH 3,0 como meio de cultura. O rendimento de produção de biocorante para as cores amarelo e vermelho foram, respectivamente,  $(0,993 \pm 0,015)$  UA/g de substrato e  $(1,578 \pm 0,044)$  UA/g de substrato.

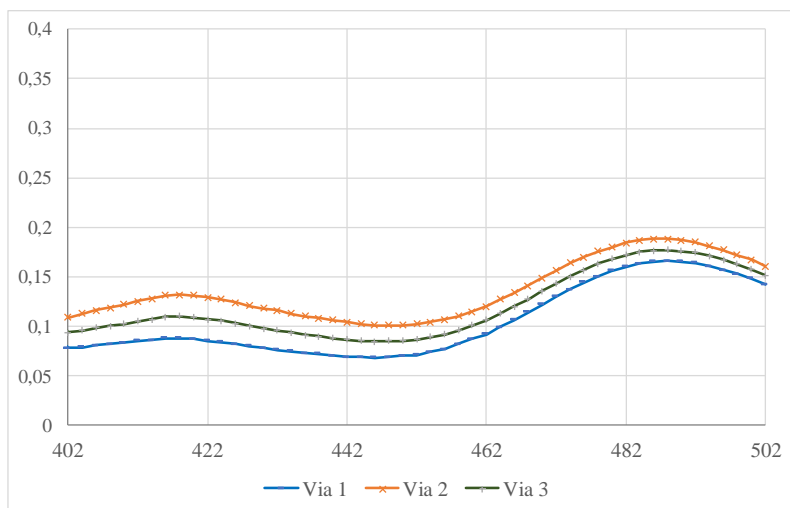
**Figura 5.33:** Espectro UV do biocorante de *Monascus purpureus* cultivado em solução aquosa de pelo hidrolisado a pH 3,0 como meio de cultivo.



A Figura 5.34 apresenta as três vias do espectro UV-vis do biocorante de *Monascus purpureus* cultivado em solução aquosa de pelo bruto moído como meio de cultivo. O

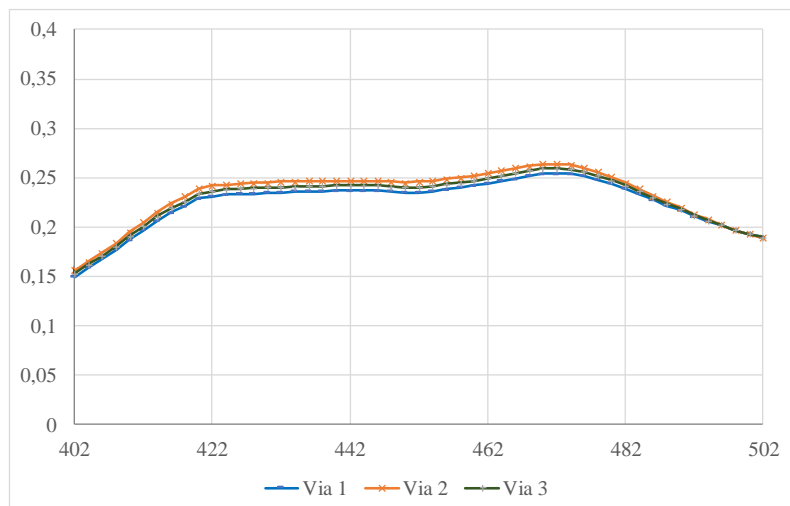
rendimento de produção de biocorante para as cores amarelo e vermelho foram, respectivamente,  $(0,545 \pm 0,022)$  UA/g de substrato e  $(0,880 \pm 0,011)$  UA/g de substrato.

**Figura 5.34:** Espectro UV-vis do biocorante de *Monascus purpureus* cultivado em solução aquosa de pelo bruto moído como meio de cultura.



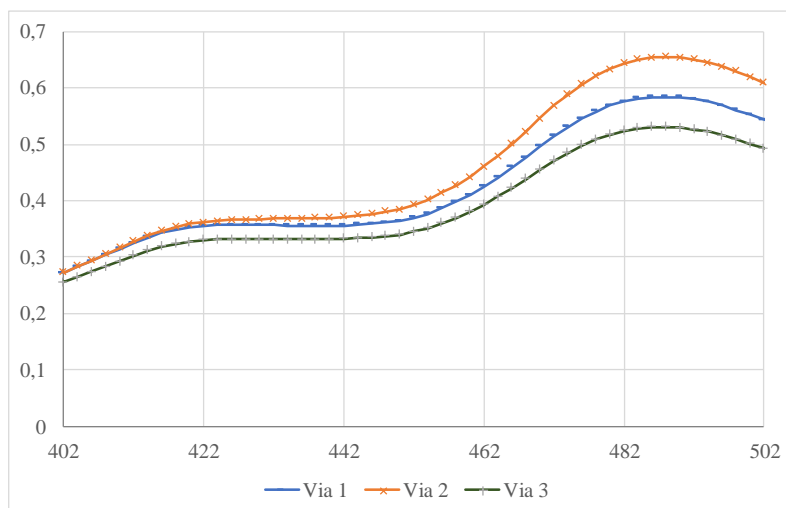
A Figura 5.35 apresenta as três vias do espectro UV-vis do biocorante de *Monascus purpureus* cultivado em solução aquosa de Batata Dextrose comercial como meio de cultura, o qual apresentou o menor desvio padrão dentre os substratos testados, resultando em curvas de varredura praticamente sobrepostas. O rendimento de produção de biocorante para as cores amarelo e vermelho foram, respectivamente,  $(1,170 \pm 0,005)$  UA/g de substrato e  $(1,093 \pm 0,002)$  UA/g de substrato.

**Figura 5.35:** Espectro UV-vis do biocorante de *Monascus purpureus* cultivado em solução aquosa de Batata Dextrose comercial como meio de cultura.



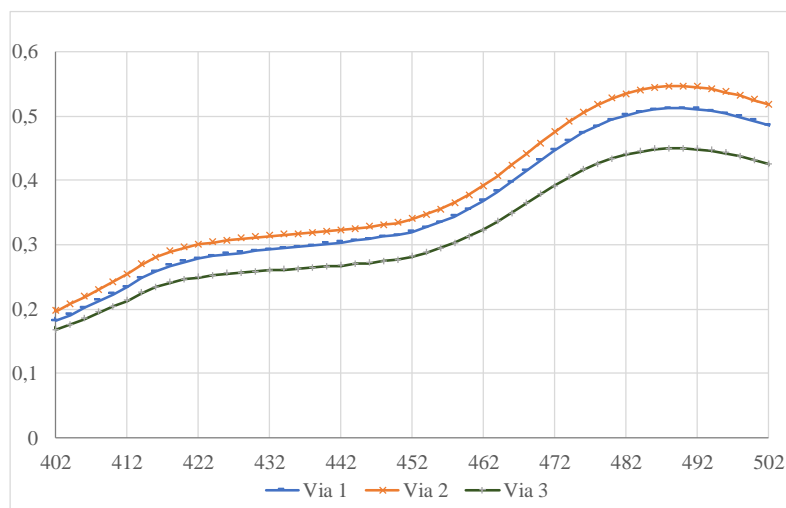
A Figura 5.36 apresenta as três vias do espectro UV-vis do biocorante de *Monascus purpureus* cultivado em solução aquosa de Peptona como meio de cultura. O rendimento de produção de biocorante para as cores amarelo e vermelho foram, respectivamente,  $(1,733 \pm 0,017)$  UA/g de substrato e  $(2,944 \pm 0,062)$  UA/g de substrato.

**Figura 5.36:** Espectro UV-vis do biocorante de *Monascus purpureus* cultivado em solução aquosa de Peptona comercial como meio de cultura.



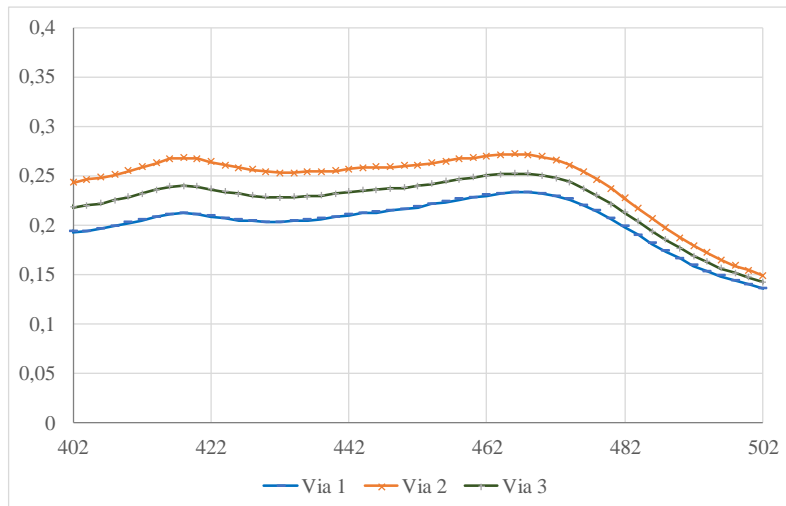
A Figura 5.37 apresenta as três vias do espectro UV-vis do biocorante de *Monascus purpureus* cultivado em solução aquosa de Peptona e Batata Dextrose como meio de cultura. O rendimento de produção de biocorante para as cores amarelo e vermelho foram, respectivamente,  $(1,357 \pm 0,025)$  UA/g de substrato e  $(2,513 \pm 0,049)$  UA/g de substrato.

**Figura 5.37:** Espectro UV do biocorante de *Monascus purpureus* cultivado em solução aquosa de Peptona e Batata Dextrose comercial como meio de cultura.



A Figura 5.38 apresenta as três vias do espectro UV-vis do biocorante de *Monascus purpureus* cultivado em solução aquosa de Dextrose comercial como meio de cultura. O rendimento de produção de biocorante para as cores amarelo e vermelho foram, respectivamente,  $(1,195 \pm 0,028)$  UA/g de substrato e  $(0,883 \pm 0,011)$  UA/g de substrato.

**Figura 5.38:** Espectros UV do biocorante de *Monascus purpureus* cultivado em solução aquosa de dextrose comercial como meio de cultura.



## Capítulo 6

### Conclusões

De acordo com os resultados obtidos na presente tese é possível apresentar as seguintes conclusões:

- a) a partir dos estudos bibliográficos realizados para o planejamento deste trabalho foi apresentado o estado da arte das pesquisas atuais referentes às aplicações de corantes naturais fúngicos.
- b) A rotina apresentada de estudos para seleção de biocorantes fúngicos, para identificação DNA genômico, para aplicação no tingimento de couro, para produção por cultivos submersos de fungos filamentosos e de estudo dos aspectos técnicos e de produtividade por espectroscopia de FTIR, UV-vis e gravimetria foram descritas e exemplificadas com os experimentos feitos.
- c) Os fungos filamentosos selecionados *Aspergillus niger* IFL5, *Penicillium chrysogenum* IFL1, *Penicillium herguei*, *Penicillium vasconiae* IFL4, *Monascus purpureus* NRRL1992, *Fusarium oxysporium*, *Fusarium graminearum*, LPM 1473 e LPM 1504 produzem corantes naturais como metabólitos secundários quando incubados em cultivo submerso com meio de batata dextrose, porém somente o corante extraído do *Monascus purpureus* demonstrou potencial para utilização no tingimento de couro.

- c) O corante extraído de *Monascus purpureus* apresentou a maior produtividade dentre os fungos filamentosos testados e foi eficiente no tingimento do couro, apresentando bom poder de tingimento, penetração e esgotamento no banho (acima de 70% de aproveitamento do corante usado), resultando em boas propriedades de resistência ao calor (grau 4/5 na escala de cinzas) e à migração em PVC (grau 3/4 na escala de cinzas). No entanto, apresentou baixa resistência à luz ultravioleta (grau 1 na escala de cinzas).
- d) Através do procedimento de identificação genômica foi possível identificar o fungo LPM 1473 como *Chaetomium aureum*.
- e) A melhor condição adotada para tingimento de couro, que resultou em absorção de 72% de corante, foi com uma etapa de adição de biocorante de *M. purpureus* a temperatura ambiente, com ajuste de pH de desacidulação em 5,0, com fixação com ácido fórmico e com uso de auxiliar de tingimento.
- f) O reaproveitamento do pelo proveniente da depilação “*hair saving*” é uma promissora oportunidade de valorização do subproduto da indústria coureira e potencial alternativa para redução do custo de produção de biocorantes fúngicos, sendo que a hidrólise ácida deste resíduo com uso de HCl 6 N por 24 h a 60 °C e posterior ajuste de pH a 6,5 com Hidróxido de Sódio 6 N demonstrou ser um procedimento simples e eficiente para preparação de substrato para cultivo submerso de *M. purpureus*.
- g) O cultivo submerso de *M. purpureus* utilizando substrato de pelo hidrolisado apresentou bons rendimentos de produção de biocorante, comparativamente com meios comerciais.

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

- Realização de estudos de encapsulamento do biocorante para aumentar a estabilidade a luz e avaliação no tingimento de couro em aumento de escala;
- Aplicação de biocorantes em outros substratos, como matrizes poliméricas;

- 
- Estudar o consumo de nitrogênio e carbono total durante o cultivo submerso de *Monascus purpureus* utilizando como substrato pelo hidrolisado em diferentes concentrações;
  - Realizar produção de biocorante de *Monascus purpureus* em escala piloto utilizando pelo hidrolisado como substrato e realizar um estudo de viabilidade econômica;
  - Avaliar a produção de micotoxina citrina nas amostras de biocorante produzidas a partir de cultivo de pelo hidrolisado.





## Referências Bibliográficas

ABQTIC. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS QUÍMICOS E TÉCNICOS DA INDÚSTRIA DO COURO. Guia do Couro. 2018.

AAFA. AMERICAN APPAREL & FOOTWEAR ASSOCIATION. Restricted Substance List, v. 19, 2018.

ABIQUIM. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA. Atividades Setoriais - Corantes e Pigmentos. Disponível em [http://www.abiquim.org.br/corantes/cor\\_classificacao.asp](http://www.abiquim.org.br/corantes/cor_classificacao.asp), acessado novembro de 2011.

AFIRM. APPAREL AND FOOTWEAR INTERNATIONAL GROUP. Restricted Substances List, v. 3, 2018.

ALVES, R.W. Extração de Corantes de Urucum por Processos Adsorptivos Utilizando Argilas Comerciais e Colloidal Gas Aphrons. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2005.

ANDRIOLI, E. Depilação enzimática-oxidativa de peles para curtimento. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

ANDRIOLI, E., GUTTERRES, M. Associated use of Enzymes and Hydrogen Peroxide for Cowhide Hair Removal, JALCA, v. 109, p. 41- 48, 2014.

ANDRIOLI, E., PETRY, L., GUTTERRES, M. Environmentally friendly hide unhairing: Enzymatic-oxidative unhairing as an alternative to use of lime and sodium sulfide. Proc. Safety Environ. Protec., v. 93, p. 9-17, 2015.

ANZANI, C., PRANDI, B., BUHLER, S., TEDESCHI, T., BALDINELLI, C., SORLINI, G., DOSSENA, A., SFORZA, S. Towards environmentally friendly skin unhairing

process: A comparison between enzymatic and oxidative methods and analysis of the protein fraction of the related wastewaters. *Journal of Cleaner Production*, v. 164, p. 1446-1454, 2017.

AQUIM, P.M. *Gestão em Curtumes: Uso Integrado e Eficiente da Água*. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

ARULDASS, C.A., DUFOSSE, L., AHMAD, W.A. Current perspective of yellowish-orange pigments from microorganisms. *Journal of Cleaner Production*, v. 180, p. 168-182.

BABITHA, S., CARVALHO, 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.

BACARDIT, A., JORBA, M., FONT, J., SHENDRIK, A., OLLÉ L. Biodegradation of Leather Tanned with Inorganic Salts, *SLTC Journal*, v.95, p. 63-67, 2012.

BAO, Y., GUO, J.J., MA, J.Z., LI, M., LI, X.L. Physicochemical and antimicrobial activities of cationic gemini surfactants with polyether siloxane linked group. *Journal of Molecular Liquids*, v. 242, p. 8-15, 2017a.

BAO, Y., GUO, J.J., MA, J.Z., LIU, P., KANG, Q.L., ZHANG, J. Cationic silicon-based gemini surfactants: Effect of hydrophobic chains on surface activity, physic-chemical properties and aggregation behaviors. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 53, p. 51-61, 2017b.

BAO, Y., ZHANG, Y., GUO, J., MA, J., LU, Y. Application of green cationic silicon-based gemini surfactants to improve antifungal properties, fiber dispersion and dye absorption of sheepskin. *Journal of Cleaner Production*, v. 206, p. 430-437, 2019.

BASF AKTIENGESELLSCHAFT. *Pocket Book for the Leather Technologist*, ed. 4, 2007.

BEGHETTO, V., ZANCANARO, A., SCRIVANTI, A., MATTEOLI, U., POZZA, G. *The Leather Industry: A Chemistry Insight Part I: An Overview of the Industrial Process*. sciences at ca' foscari, p. 13-22, 2013.

BELESKA, K., VALEIKA, V., ŠIRVAITYTĖ, J., VALEIKIENĖ, V. Chromed Leather Dyeing Peculiarities when Delimiting with Peracetic Acid. *Materials Science*, v. 19, n.2, p.152-157, 2013.

BESSETTE A.R., BESETTE A.E. *The rainbow beneath my feet: a mushroom dyer's field guide*. Nova Iorque - University Press, 2001.

BORDIGNON, S., FUCK, W.F., VELHO, S.K., SCHOR, A.V., COOPER, M. BRESOLIN, L., GUTTERRES, M. Novel natural dyes for eco-friendly leather articles, *Journal of Asociación Química Española de la Industria del Cuero*, 63, n. 4, p. 93-99, 2012.

BRAKHAGE, A.A., SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites - Strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genetics and Biology*, v. 48, n. 1, p.15-22, 2011.

BRYANT, F.O., CUTLER, H.G. E JACYNO, J.M. Properties and Cost Effective Method for Production of the Antitumor Agent Duclauxin from Sporulating *Penicillium herquei*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 82, n. 2, 1993.

CHATTERJEE, S., MAITY, S., CHATTOPADHYAY, P., SARKAR, A., LASKAR, S., SEN, S.K. Characterization of Red Pigment from *Monascus* in Submerged Culture - Red Pigment from *Monascus Purpureus*. *Journal of Applied Sciences Research*, v. 5, n. 12, p. 2102-2108, 2009.

CHEMSPIDER. Chemical structure database, Royal Society of Chemistry, Acessado em agosto de 2018, disponível em <http://www.chemspider.com/>.

CHRISTIE, R.M. Colour Chemistry. The Royal Society of Chemistry, Londres, ed.2 ISBN 978-1-84973-328-1, 2015.

CICB. CENTRO DAS INDÚSTRIAS DE CURTUMES DO BRASIL. O Couro e o Curtume brasileiro. Disponível em <http://www.cicb.org.br/cicb/sobre-couro>, acessado em setembro de 2018.

CLARIANT, Catálogo de corantes para tingimento de couro, disponível em <https://www.clariant.com/pt/Business-Units/Pigments/Coatings/Industrial-Coatings/Dyes>, acessado em julho de 2014.

COVINGTON, A.D., Tanning Chemistry: The Science of Leather, The Royal Society of Chemistry, Londres, ISBN: 978-1-84973-434-9, p.483, 2011.

CUERONET, Teñido, disponível em <http://www.cueronet.com/flujoograma/tenido3.htm>, acessado em julho de 2014.

D'ISCHIA, M., WAKAMATSU, K., NAPOLITANO, A., BRIGANTI, S., GARCIA-BORRÓN, J-C., KOVACS, D., MEREDITH, P., PEZZELLA, A., PICARDO, M., SARNA, T., SIMON, J.D., ITO, S. Melanins and melanogenesis: Methods, standards, protocols. *Pigment Cell and Melanoma Research*, v. 26, n. 5, p. 616-633, 2013.

DAROIT, J.D., SILVEIRA, S.T., HERTZ, P. F., BRANDELLI, A. Production of extracellular  $\beta$ -glucosidase by *Monascus purpureus* on different growth substrates. *Process Biochemistry*, v. 42, n.5, p. 904-908, 2007.

DE CARVALHO, J.C. Desenvolvimento de Bioprocesso para a Produção de Pigmentos a partir de *Monascus* por fermentação em Substrato Sólido. Tese (Doutorado Processos Biotecnológicos). Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

DE CARVALHO, J. C., OISHI, B.O., PANDEY, A., SOCCOL, C.R. Biopigments from *Monascus*: Strains Selection, Citrinin Production and Color Stability. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, n. 6, p. 885-894, 2005.

DE CARVALHO, J.C. Perspectivas do uso de biocorantes na indústria de alimento. VII SIAL - Simpósio de Alimentos para a Região Sul. Disponível em [http://www.upf.br/sial2011/download/Biopigmentos-Julio\\_C\\_Carvalho.pdf](http://www.upf.br/sial2011/download/Biopigmentos-Julio_C_Carvalho.pdf), acessado em setembro de 2011.

DE SANTIS, D., MORESI, M., GALLO, A.M., PETRUCCIOLI, M. Assessment of the dyeing properties of pigments from *Monascus purpureus*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 80, n. 9, p. 1072-1079, 2005.

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

DETTMER, A., CAVALHEIRO, J.C., CAVALLI, É., ROSSI, D.M., GUSATTI, C.S., AYUB, M.A.Z., GUTTERRES, M. Optimization of the Biotechnological Process for Hide Unhairing in Substitution of Toxic Sulfides. *Chemical Engineering & Technology*, 35, 803-810, 2012b.

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*, 35, 1317, 2012c.

DETTMER, A, CAVALLI, É, AYUB, M.A.Z., GUTTERRES, M. Environmentally friendly hide unhairing: enzymatic hide processing for the replacement of sodium sulfide and delimidig. *Journal of Cleaner Production* (in press), 2013.

DOS SANTOS, A.B., CERVANTES, F.J., VAN LIER, J.B. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2369–2385, 2007.

DUFOSSÉ, L., FOUILLAUD, M., CARO, Y., MAPARI, S.A.S. SUTTHIWONG, N. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 26, p. 56-61, 2014.

DUFOSSÉ, L. Capítulo 16 - Current and potential natural pigments from microorganisms (bacteria, yeasts, fungi, microalgae). In: Carle, R., Schweiggert, R. (Eds.), Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages. Industrial Applications for Improving Food Colour, 1st edition. Woodhead Publishing, p. 337-354, ISBN 978-0- 08-1003718, 2016.

DUFOSSÉ, L. Pigments, microbial. Reference Module in Life Sciences. Elsevier Publisher, Oxford, UK, pp. 1–16. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8>. 13091-2. ISBN 978-0-12-809633-8, 2017.

DUFOSSÉ, L. Red colourants from filamentous fungi: Are they ready for the food industry? Journal of Food Composition and Analysis, v. 69, p.156-161, 2018.

ECHA. EUROPEAN CHEMICALS AGENCY. Disponível em [http://echa.europa.eu/home\\_en.asp](http://echa.europa.eu/home_en.asp), acessado em setembro de 2018.

FABJAN, E.S., SKAPIN, A.S., SKRLEP, L., ZIVEC, P., CEH, M., GABERSCEK, M. Protection of organic pigments against photocatalysis by encapsulation. J Sol-Gel Sci Technol, p. 65-74, 2012.

EPOSITO, E., DE AZEVEDO, J.L. Fungos - Uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia. Ed. EDUCS, ed. 2, Caxias do Sul, 2010.

FENG, Y., SHAO, Y., CHEN, F. *Monascus* pigments. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 96, p. 1421-1440, 2012.

FONTINELE, L.P., SOUSA, R.C., VIANA, V.G.F., FARIAS, E.A.O., QUEIROZ, E.L., EIRASA, C. Norbixin extracted from urucum (*Bixa orellana* L.) for the formation of conductive composites with potential applications in electrochemical sensors. Surfaces and Interfaces, v. 13, p. 92–100, 2018.

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

FUCK, W. F., GUTTERRES, M., MARCÍLIO, N. R., BORDIGNON, 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.

FUCK, W.F., GRASSELLI, L.P., LOPES, F. C., BRANDELLI, A., GUTTERRES, M., Development of fungal dyes and application in the leather dyeing, XXXII Congresso da IULTCS, Istanbul / Turquia, 2013.

FUCK, W.F., BRANDELLI, A., GUTTERRES, M. Special Review Paper: Leather Dyeing with Biodyes from Filamentous Fungi. JALCA, v. 113, p. 299-310, 2018a.

FUCK, W.F., LOPES, F. C., BRANDELLI, A., GUTTERRES, M. Screening of Natural Dyes from Filamentous Fungi and Leather Dyeing with *Monascus purpureus* Extract. SLTC Journal, v. 102, p. 69-74, 2018b.

FUNGARO, M.H.P. PCR na Micologia. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v.14, p. 12-16, 2000.

GALARZA, B.C., CAVELLO, I., GRECO, C.A., HOURS, R., SCHULDT, M.M., CANTERA, C.S. Alternative Technologies for Adding Value to Bovine Hair Waste. Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists, v. 94, p. 26-32, 2009.

GAO, S.S., ZHANG, T., GARCIA-BORRÀS, M., HUNG, Y.S., BILLINGSLEY, J.M., HOUK, K.N., HU, Y., e TANG, Y. Biosynthesis of Heptacyclic Duclauxins Requires Extensive Redox Modifications of the Phenalenone Aromatic Polyketide. J. Am. Chem. Soc., v. 140, p. 6991-6997, 2018.

GOMES, C.S, PICCIN J.S., GUTTERRES, M. Optimizing adsorption parameters in tannery-dye-containing effluent treatment with leather shaving waste. Process Safety and Environmental Protection, v. 99, p. 98-106, 2016.

GRASSEL, F.S., FERRÃO, M.F. e WOLF, C.R. Development of methodology for identification the nature of the polyphenolic extracts by FTIR associated with multivariate analysis. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v.153, 15, p. 94-101, 2016.

SPIER, F. FUCK, W.F. JACINTO, M.A.C., GUTTERRES, M. Absorption and fixation of vegetable tannins by collagen. Journal of AQEIC. Asociación Química Española de la Industria del Cuero, v. 68, p. 93-97, 2017.

GUARATINI, C.C.I., ZANONI, M.V.B. Textile dyes. Quimica Nova, v. 23, n. 1, p. 71-78, 2000.

GUTTERRES, M., OSÓRIO, T.S. Métodos analíticos especiais aplicados ao couro. Anais do congresso AAQTIC - Asociación Argentina de los Químicos y Técnicos de La Industria Del Cuero, 2004.

GUTTERRES, M. A Estrutura de Colagênio da Pele. A Ciência Rumo à Tecnologia do Couro, v. 1, p. 262-269, 2008.

GUTTERRES, M. Apostila Tecnologia do Couro I e II, 2011 (graduação), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

GUTTERRES, M., MANCOPEDES, F. Analysis of Structure and Properties of Hydrophobic and Non-Hydrophobic Fatliquored Leather. JSLTC, v.97, p. 68- 73, 2013.

GUTTERRES, M., MELLA, B. CHAPTER 16: Chromium in Tannery Wastewater, Livro Heavy Metals in Water: Presence, Removal and Safety, The Royal Society of Chemistry, 2014.

HAJJAJ, H., FRANÇOIS, J.M., GOMA, G., BLANC P.J. Effect of Amino Acids on Red Pigments and Citrinin Production in *Monascus ruber*. J. Food Sci., v.77, n. 3, p 156-159, 2012.

HAQUE, M.A., KACHRIMANIDOU, V., KOUTINAS, A., LIN, C.S..K. Valorization of bakery waste for biocolorant and enzyme production by *Monascus purpureus*. Journal of Biotechnology, n. 231, p. 55-64, 2016.

HAMICHE, S., MECHRI, S., KHELOUIA, L., ANNANE, R., EL HATTAB, M., BADIS, A., JAOUADI, B. Purification and biochemical characterization of two keratinases from *Bacillus amyloliquefaciens* S13 isolated from marine brown alga *Zonaria tournefortii* with potential keratin-biodegradation and hide-unhairing activities. International Journal of Biological Macromolecules, v. 122, p. 758-769, 2019.

HAROUN, A.A. Evaluation of modified leather dyeing technique using black dyestuffs from the economical view. Dyes and Pigments, v. 67, n.3, p. 215- 221, 2005.

HAROUN, A.A., MANSOUR, H.F. New approaches for the reactive dyeing of the retanned carbohydrate crust leather. Dyes and Pigments, v. 76, n. 1, p. 213-219, 2008.

HEIDEMANN, E. Fundamentals of leather manufacturing, Eduard Roetger KG Darmstadt, p. 432-460, 1993.

HENSON, J.M., BUTLER, M.J., DAY, A.W. The Dark Side of the Mycelium: Melanins of Phytopathogenic Fungi. Annual Review of Phytopathology, v. 37, p. 447-471, 1999.

HILARES, R.T., DE SOUZA, R.A., MARCELINO, P.F., DA SILVA, S.S., DRAGONE, G., MUSSATTO, S.I., SANTOS, J.C., Sugarcane bagasse hydrolysate as a potential feedstock for red pigment production by *Monascus ruber*, Food Chemistry, v. 245, p. 786-791, 2018.

HU, J., NAGARAJAN, D., ZHANG, Q., CHANG, J.S., LEE, D.J. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. Biotechnology Advances, v. 36, n. 1, p. 54-67, 2018.

HULEIHEL, M., SHUFAN, E., TSROR, L., SHARAHA, U., LAPIDOT, I., MORDECHAI, S., SALMAN, A. Differentiation of mixed soil-borne fungi in the genus level using infrared spectroscopy and multivariate analysis. J. Photoch. Photobio. B, v. 180, p. 155-165, 2018.



HUSSAIN, G., ABASS, N., SHABIR, G., ATHAR, M., SAEED, A., SALEEM, R., ALI, F., KHAN, M.A. New acid dyes and their metal complexes based on substituted phenols for leather: Synthesis, characterization and optical studies. *Journal of Applied Research and Technology*, v.15, p. 346-355, 2017a.

HUSSAIN, G., KHAN, S.A., AHMAD, W., ATHAR, M., SALEEM, R. A kinetic study of rubazoic acid formation derived from 4-Amino-1(4Sulphophenyl) 3-Methyl-2-Pyrazolin-5-One, *Int. J. Adv. Res.*, v. 5, n. 4, p. 234-241, 2017b.

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

JIANG, D., ZHU, W., WANG, Y., SUN, C., ZHANG, K.Q., YANG, J. Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: Recent advances and new strategies. *Biotechnology Advances*, v. 31, p. 1562-1574, 2013.

JØRGENSEN, T.R., JOOHAE PARK, ARENTSHORST, M., VAN WELZEN, A.M., LAMERS, G., VANKUYK, P.A., DAMVELD, R.A., VAN DEN HONDEL, C.A.M., NIELSEN, K.F., FRISVAD, J.C., RAM, A.F.J. The molecular and genetic basis of conidial pigmentation in *Aspergillus niger*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 48, p. 544-553, 2011.

KANAGARAJ, J., PANDA, R.C. Modeling of dye uptake rate, related interactions, and binding energy estimation in leather matrix using protein based nanoparticle polymer. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 50, n. 22, p. 12400-12408, 2011.

KANAGARAJ, J., PANDA, R.C., SENTHILVELAN, T., GUPTA, S. Cleaner approach in leather dyeing using graft copolymer as high performance auxiliary: related kinetics and mechanism. *J. Clean. Prod.*, 112, 4863-4878, 2016.

KANTH S.V., VENBA, R., JAYAKUMAR G.C., CHANDRABABU N.K. Kinetics of leather dyeing pretreated with enzymes: Role of acid protease. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 8, p. 2430–2435, 2009.

KANTIFEDAKI, A., KACHRIMANIDOU, V., MALLOUCHOS, A., KOUTINAS, A.A., PAPANIKOLAOU, S. Orange processing waste valorization for the production of bio-based pigments using the fungal strains *Monascus purpureus* and *Penicillium purpurogenum*. *Jornal of Cleaner Production*, v. 185, p. 882-890, 2018.

KEMPKEN, F., ROHLFS, M. Fungal secondary metabolite biosynthesis - a chemical defense strategy against antagonistic animals? *Fungal Ecology*, v. 3, n. 3, p. 107-114, 2010.

KHAN, S.A., SHAHID, S., KANWAL, S., HUSSAIN, G. Synthesis characterization and antibacterial activity of Cr (III), Co (III), Fe (II), Cu (II), Ni (III) complexes of 4-(2-(((2-hydroxy-5-nitrophenyl) diazenyl) (phenyl) methylene) hydrazinyl) benzene sulfonic acid based formazan dyes and their applications on leather, *Dyes and Pigments*, v. 148, p. 31-43, 2018.

KHAN, S.A., SHAHID, S., KANWAL, S., RIZWAN, K., MAHMOOD, T., AYUB, K. Synthesis of novel metal complexes of 2-((phenyl (2-(4-sulfophenyl) hydrazono) methyl) diazenyl) benzoic acid formazan dyes: Characterization, antimicrobial and optical properties studies on leather. *Journal of Molecular Structure*, v. 1175, p. 73-89, 2019.

KIM, W.J., HEO, J.S., SHIN, S.B., KO, J.Y. Measurement of colour difference in the leather dyeing process with natural dyes. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, v. 87, n. 1, p. 25, 2002.

KIRTI, K., AMITA, S., PRITI, S., KUMAR, A.M., JYOTI, S. Colorful World of Microbes: Carotenoids and Their Applications. *Adv Biol*, Article ID 837891, p.13., 2014.

KOGKAKI, E.A., SOFOULIS, M., NATSKOULIS, P., TARANTILIS, P.A., PAPPAS, C.S., PANAGO, E.Z. Differentiation and identification of grape-associated black aspergilli using Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic analysis of mycelia. *International Journal of Food Microbiology*, v. 259, p. 22-28, 2017.

KOSA, G., SHAPAVAL, V., KOHLER, A., ZIMMERMANN, B. FTIR spectroscopy as a unified method for simultaneous analysis of intra and extracellular Metabolites in high-throughput screening of microbial bioprocesses. *Microb Cell Fact*, v. 16, n. 1, 195, 2017.

KUMAR, A., ASTHANA, M., GUPTA, A., NIGAM, D., MAHAJAN, S. Chapter 3 - Secondary Metabolism and Antimicrobial Metabolites of *Penicillium*. In: Gupta, V.K., Rodriguez-Couto, S. (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, p. 47-68, ISBN 9780444635013, 2018.

LECELLIER, A., GAYDOU, V., MOUNIER, J., HERMER, A., CASTREC, L., BARBIER, G., ABLAIN, W., MANFAIT, M., TOUBAS, D., SOCKALINGUM, G.D., Implementation of an FTIR spectral library of 486 filamentous fungi strains for rapid identification of molds, *Food Microbiology*, v. 45, p. 126-134, 2015.

LECELLIER, A., MOUNIER, J., GAYDOU, V., CASTREC, L., BARBIER, G., ABLAIN, W., MANFAIT, M., TOUBAS, D., SOCKALINGUM, G.D. Differentiation and identification of filamentous fungi by high-throughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia, *International Journal of Food Microbiology*, v. 168-169, p. 32-41, 2014.

LEE, S.C., SHIN, E.C., KIM, W.J., PARK, S.M. Dyeing Process for Improving Properties of Black Color Using Natural Dyes and Mordant. *JALCA*, v. 107, 2012.

LI, J., YAN, L., SHI, B., LI, B., ZHANG, J. A Novel Approach to Clean Tanning Technology. *J. Chem. Chem. Eng.* v. 7, p. 1203-1212, 2013.

LIAN, X., WANG, C., GUO, K. Identification of new red pigments produced by *Monascus ruber*. *Dyes and Pigments*, v. 73, n.1, p. 121-125, 2007.

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.

LOPES, F.C., *Produção e Análise de Metabólitos Secundários de Fungos Filamentosos. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.*

LOPES, F.C., TICHOTA, D.M., PEREIRA, J.Q., SEGALIN, J., RIOS, A.O., BRANDELLI, A. Pigment Production by Filamentous Fungi on Agro-Industrial Byproducts: an Eco-Friendly Alternative. *Appl Biochem Biotechnol.*, v. 171, n. 3, p. 616-625, 2013a.

LOPES, F.C., TICHOTA, D.M., SAUTER, I.P., MEIRA, S.M.M., SEGALIN, J., ROTT, M.B., RIOS, A.O., BRANDELLI, A. Active metabolites produced by *Penicillium chrysogenum* IFL1 growing on agro-industrial residues. *Annals of Microbiology*, v. 63, n. 2, p. 771-778, 2013b.

LUETHY, P.M., ZELAZNY, A.M. Rapid one-step extraction method for the identification of molds using MALDI-TOF MS. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 91, p. 130-135, 2018.

LUNA, F.F.A. Capítulo 4 - The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology presents the state-of-the-art for MALDI-TOF mass spectrometry. In: Cobo, F. (Ed.). *Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Fungal Diagnosis*, Elsevier, p. 197-211, 2018.

LWG. Leather Working Group. Disponível em <https://www.leatherworkinggroup.com/>, acessado em setembro de 2018.

MALDONADO, M.C., IBARRA, L.V. Organic dyes from fungi and lichens. In *Biodiversity of Fungi Their Role in Human Life* (Deshmukh, S.K. and Rai, M.K., eds), p. 375-407, Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd, 2005.

MANCOPE F., GUTTERRES, M., DETTMER, A., BARRIONUEVO, P. Colagênio: Estrutura, propriedades e processos. *A Ciência Rumo à Tecnologia do Couro*, v. 1, p. 425-443, 2008.

MAPARI, S.A.S., MEYER, A.S., THRANE, U. Colorimetric characterization for comparative analysis of fungal pigments and natural food colorants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 19, p. 7027-7035, 2006.

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.

MARSAL, A., CUADROS, S., CUADROS, R.M., FONT, J., MANICH, A.M. Dyestuffs and formaldehyde content in split leather treated with formaldehyde resins. *Dyes and Pigments*, v.158, p. 50-59, 2018.

MCNEIL, B., ARCHER, D., GIAVASIS, I., HARVEY, L. *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals*. Woodhead Publishing, London, p. 610, ISBN: 978-0-85709-343-1, 2013.

MEIJER, M., HOUBRAKEN, J.A.M.P., DALHUIJSEN, S., SAMSON, R.A., DE VRIES, R.P. Growth and hydrolase profiles can be used as characteristics to distinguish *Aspergillus niger* and other black aspergilli. *Stud. Mycol.*, v. 69, p. 19-30, 2011;

MELLA, B. Resíduo sólido de depilação como adsorvente de corantes para tingimento de couro. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017a.

MELLA, B., GUTTERRES, M. Preparation and characterization of tannery solid waste as an alternative biosorbent for leather dyes. *Journal of Society of Leather Technologists and Chemists*, v. 101, p. 143-148, 2017b.

MENDONÇA, J.N. Identificação e isolamento de corantes naturais produzidos por actinobactérias. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

MENGISTIE, E., SMETS, I., VAN GERVEN, T. Ultrasound assisted chrome tanning: towards a clean leather production technology. *Ultrasonics Sonochem.*, v. 32, p. 204-212, 2016.

- MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi - Progress, obstacles and future trends. *Biotechnology Advances*, v. 26, n. 2, p. 177-185, 2008.
- MILLER, F. P., VANDOME, A. F., MCBREWSTER, J., *Mycology - Biology, Fungus, Genetics, Biochemistry, Taxonomy, Tínder, Medicine*, Ed. Alphascript Pub, p.105, 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.
- MOGIANA, A físico-química da fixação, *Revista do couro*, n. 189, p.96 – 100, 2007.
- Morera, J.M., Esther Bartolí, E., Gavilanes, R.M. Hide unhairing: achieving lower pollution loads, decreased wastewater toxicity and solid waste reduction. *Journal of Cleaner Production*, v. 112, p. 3040-3047, 2016.
- MORITZ, D.E. Produção do pigmento monascus por *Monascus ruber* CCT 3802 em cultivo submerso, Tese (Doutorado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- MOSTAFA, M.E., AND ABBADY, M.S. Secondary Metabolites and Bioactivity of the *Monascus* Pigments Review Article. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, v. 9, n. 1, p. 01-13, 2014.
- MUKHERJEE G, SINGH S.K. Production and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged cultivation. *Process Biochemistry*, 46, p. 188-192, 2011a.
- MUKHERJEE, G. e SINGH, S.K., Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation, *Process Biochemistry*, v. 46, p. 188-192, 2011b.
- MYCOBANK DATABASE, Fungal Database, Nomenclature and Species Banks, acessado em agosto de 2018, disponível em <http://www.mycobank.org/>.
- 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.
- NCBI. NATIONAL LYBRARY OF MEDICINE, Standard Nucleotide blast. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, acessado setembro de 2018.
- NIGAM, S.P., LUKE, J.S. Food additives: production of microbial pigments and their antioxidant properties. *Current Opinion in Food Science*, 7, p. 93-100, 2016.

NIGAM, P.S., SINGH, A. Production of Secondary Metabolites – Fungi. Encyclopedia of Food Microbiology, ed. 2, p. 570-578, 2014.

ONEM, E., GULUMSER, G., OCAK, B. Evaluation of Natural Dyeing of Leather with *Rubia tinctorum* Extract. *Ekoloji*, v. 20, n. 80, p. 81-87, 2011.

ORTIZ-MONSALVE, S. Estudos de descoloração de corantes para couro pelo isolado nativo *Trametes villosa* SC10. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

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

PANESAR, R., KAUR, S., PANESAR, P. S. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. *Current Opinion in Food Science*, n. 1, p. 70-76, 2015;

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, v.22, p. 189-259, 2004.

PATTERSON, T.F., SUTTON, D.A. Seção C: 242 – Classificação de Fungos. In: Long, S., Prober, C. e Fischer, M. (Eds.), *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*, ed.5, p. 1229-1231, ISBN 978-0-323-40181-4, 2018.

PAUL, R., ADZET, J.M., BROUTA-AGNÉSA, M., BALSELLS, S., ESTEVE, H. Hydrolyzed collagen: A novel additive in cotton and leather dyeing. *Dyes and Pigments*, 94, n.3, p. 475 – 480, 2012.

PICCIN, J. S. Resíduo sólido da indústria coureira como adsorventes alternativos de corantes. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013a.

PICCIN, J.S., FERIS, L.A., COOPER, M. AND GUTTERRES, M. Dye Adsorption by Leather Waste: Mechanism Diffusion, Nature Studies, and Thermodynamic Data. *JCED*, v. 58, n. 4, p 873–882, 2013b.

PICCIN, J.S., GOMES, C.S., MELLA, GUTTERRES, M. Color removal from real leather dyeing effluent using tannery waste as an adsorbent. *Journal of Environmental Chemical Engineering* v. 4, p. 1061–1067, 2016.

PIEKARCZYK, J., RATAJKIEWICZ, H., JASIEWICZ, J., SOSNOWSKA, D., WÓJTOWICZ, A. An application of reflectance spectroscopy to differentiate of entomopathogenic fungi species. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.10.024>, 2018.

PRIYA, G.K., JAVID, M.M.A, GEORGE, A., AARTHY, M., ANBARASAN, S.D., KAMINI, N.R., GOWTHAMAN, M.K., ARAVINDHAN, R., GANESH, S., CHANDRASEKAR, R., AYYADURAI, N. Next generation greener leather dyeing process through recombinant green fluorescent protein. *J. Clean. Prod.*, v. 126, p. 698-706, 2016.

PÜNTENER, A.G. Chapter 11 - Leather dyes. In: Freeman, H.S., Peters, A.T. (Eds.), *Colorants for Non-Textile Applications*. Elsevier Science, Amsterdam, ed. 1, 478-557, ISBN 9780-444-82888-0, 2000.

RÄISÄNEN, R., NOUSIAINEN, P., HYNNINEN, P.H. Emodin and Dermocybin Natural Anthraquinones as High-Temperature Disperse Dyes for Polyester and Polyamide. *Textile Research Journal*, v. 71, n. 10, p. 922-927, 2001.

RÄISÄNEN, R., NOUSIAINEN, P., HYNNINEN, P.H. Dermorubin and 5-chlorodermorubin natural anthraquinone carboxylic acids as dyes for wool. *Textile Research Journal*, v. 72, n. 11, p. 973-976, 2002.

RAJASEKARAN, R., CHANDRASEKARAN, R., MUTHUSELVAM, M. Microbial biotechnology: Rapid Advances in an area of massive impact. *Advanced Biotech*, v. 7, n.5, p. 19-25, 2008.

REVILLA, J. *Corantes Naturais*. Ed. SEBRAE / AM: INPA, p. 184, 2004.

RIBAS, M.C. *Remoção de Corantes Têxteis pelo Processo de Adsorção Utilizando Carvão Ativado Produzido a partir de Subprodutos Agroindustriais – Estudos em Batelada e Coluna de Leito Fixo*. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

RITTERBUSCH, D.F., DIAS, M.M., AQUIM, P.M., VARGAS, A.S. Testes físico-mecânicos em couros. *Revista do Couro*, p. 75-81, 2014.

RODRIGUEZ-COUTO, S. Degradation of Azo Dyes by White-Rot Fungi. In: SINGH, S.N. (Ed.). *Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewater*. Environmental Science and Engineering. Springer International Publishing, p. 315-331, 2015.

ROSALES, E., MEIJIDE, J., TAVARES, T., PAZOS, M., SANROMÁN, M.A. GRAPEFRUIT peelings as a promising biosorbent for the removal of leather dyes and hexavalent chromium. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 101, p. 61-71, 2016.

ROSSI, T., SILVA, P.M.S., DE MOURA, L.F., ARAÚJO, M.C., BRITO, J.O. FREEMAN, H.S. Waste from eucalyptus wood steaming as a natural dye source for textile fibers. *Journal of Cleaner Production*, v. 143, p. 303-310, 2017.

ROZE, L. V., CHANDA, A., LINZ, J.E. Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: A new understanding of established cellular processes. *Fungal genetics and Biology*, v. 48, n. 1, p. 35-48, 2011.

SALMAN, A., TSROR, L., POMERANTZ, A., MOREH, R., MORDECHAI, S., e HULEIHEL, M., FTIR spectroscopy for detection and identification of fungal phytopathogenes, *Spectroscopy*, v. 24, p. 261-267, 2010.

SAMANTA, A.K., AGARWAL, P. Application of natural dyes on textiles. *Indian J. Fibre Text. Res.*, v. 34, p. 384-399, 2009.

SANTOS, C., FRAGA, M.E., KOZAKIEWICZ, Z., LIMA, N. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Research in Microbiology*, v. 161, p. 168-175, 2010.

SCHMALER-RIPCKE, J., SUGAREVA, V., GEBHARDT, P., WINKLER, R., KNIEMEYER, O., HEINEKAMP, T., BRAKHAGE, A.A. Production of Pyomelanin, a Second Type of Melanin, via the Tyrosine Degradation Pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 493-503, 2009.

SECEX. Secretaria de Comércio Exterior. Exportações Brasileiras de Couros e Peles, disponível em <http://www.cicb.org.br/cicb/dados-do-setor>, Acessado em setembro de 2018.

SELVI, A.T., ARAVINDHAN, R., MADHAN, B., RAO, J.R. Studies on the application of natural dye extract from *Bixa orellana* seeds for dyeing and finishing of leather. *J. Ind. Crop*, v. 43, p. 84-86, 2013.

SHAHID, M., SHAHID-UL-ISLAM, MOHAMMAD, F. Recent advancements in natural dye applications: a review. *Journal of Cleaner Production* v. 53, p. 310-331, 2013.

SHIMADZU. Espectrometria de Ultravioleta-visível - Fundamentos e instrumentação, 2012.

SIDDIQUEE, S. Chapter 4 - Recent Advancements on the Role of Biologically Active Secondary Metabolites from *Aspergillus*. In: Gupta, V.K., Rodriguez-Couto, S. (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, p. 69-94, ISBN 9780444635013, 2018.

SILVEIRA, S.T., DAROIT, D.J., SANT'ANNA, V., BRANDELLI, A. Stability Modeling of Red Pigments Produced by *Monascus purpureus* in Submerged Cultivations with Sugarcane Bagasse. *Food Bioprocess Technol*, 6, p. 1007–1014, 2013;



- SINGH, N., GOEL, G., SINGH, N., PATHAK, B.K., KAUSHIK, D. Modeling the red pigment production by *Monascus purpureus* MTCC 369 by Artificial Neural Network using rice water based medium. Food Bioscience, v.11, p. 17-22, 2015;
- 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.
- SIVAKUMAR, V., SWAMINATHAN, G., RAO, P.G., RAMASAMI, T. Influence of ultrasound on diffusion through skin / leather matrix. Chemical Engineering and processing, v. 47, n. 12, p. 2076-2083, 2008.
- 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.
- SIVAKUMAR, V., VIJAYEESWARRI, J., ANNA, J.L. Effective natural dye extraction from different plant materials using ultrasound. Industrial Crops and Products, v. 33, p. 116-122, 2011.
- SOCRATES, G. Infrared and Raman Characterist Group Frequencies, ed. 3, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, UK, 2001.
- SOLANO, F. Review Article Melanins: Skin Pigments and Much More - Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation Routes. New Journal of Science, v. 2014.
- SRIANTA, I., RISTIARINI, S., NUGERAHANI, I., SEN, S. K., ZHANG, B. B., XU, G. R., BLANC, P.J. Recent research and development of *Monascus* fermentation products. International Food Research Journal, v. 21, n. 1, p. 1-12, 2014.
- SRIANTA, I., ZUBAIDAH, E., ESTIASIH, T., YAMADA, M., HARIJONO. Comparison of *Monascus purpureus* growth, pigment production and composition on different cereal substrates with solid state fermentation. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 7, p. 181–186, 2016.
- SRIVASTAV, P., YADAV, V.K., GOVINDASAMY, S., CHANDRASEKARAN, M. Red pigment production by *Monascus purpureus* using sweet potato-based medium in submerged fermentation. Nutrafoods, v.14, n. 3, p. 159-167, 2015.
- STRINGHETA, P.C, SILVA, P.I., COSTA, A.G.V. Annatto/Urucum—Bixa Orellana. Exotic Fruits Reference Guide, p. 23-30, 2018.

TASKIN, M., SISMAN, T., ERDAL, S., KURBANOGLU, E.B. Use of waste chicken feathers as peptone for production of carotenoids in submerged culture of *Rhodotorula glutinis* MT-5. *Eur Food Res Technol*, v. 233, p. 657-665, 2011.

TFL LEATHER TECHNOLOGY Ltd., Test Methods for the Colour Fastness of Leather & Dyes v.1, 2004.

TORRES, F.A., ZACCARIM, B.R., DE LENCASTRE NOVAES, L.C., JOZALA, A.F., DOS SANTOS, C.A., TEIXEIRA, M.F., SANTOS-EBINUMA, V.C. Natural colorants from filamentous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 100, n. 6, p. 2511-2521, 2016.

TRALAMAZZA, S.M., BOZZA, A., DESTRO, J.G., RODRÍGUEZ, J.I., DO ROCIO, D.P., PIMENTEL, I.C. Potential of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) to differentiate environmental *Aspergillus* fungi species *A. niger*, *A. ochraceus*, and *A. westerdijkiae* using two different methodologies. *Appl. Spectrosc.*, v. 67, n.3, p. 274-278, 2013.

VANKAR, S.P., SHANKAR, R. AND VERMA, A. Enzymatic natural dyeing of cotton and silk fabrics without metal mordants. *J. Cleaner Production*, v. 15, 2007.

VEDARAMAN, N., MURALIDHARAN, C. Two Stage Leather Dyeing: A Novel Approach to Minimize the Dye Discharge in the Effluent. *JALCA*, v. 106, n. 6, p. 184-189, 2011.

VELHO, S.R.K., BRUM, L.F.L.W., PETTER, C.O., SANTOS, J.H.Z., SIMUNI, S., KAPPA, W.H. Development of structured natural dyes for use into plastics. *Dyes and Pigments*, v. 136, p. 248-254, 2017.

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., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P., BALACHANDAR, V., 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., LEE, K.-J., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P., 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.

VELMURUGAN, P., HUR, H., BALACHANDAR, V., KAMALA-KANNAN, S., LEE, K.J., LEE, S.M., CHAE, J.C., SHEA, P.J., OH, B.T. *Monascus* pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 112, n. 6, p. 590-594, 2011.

VELOSO, L.A. Dossiê Técnico - Corantes e Pigmentos. Serviço brasileiro de Respostas Técnicas, 2012.

VENDRUSCOLO, F., BÜHLER, R.M.M., CARVALHO, J.C, OLIVEIRA, D., MORITZ, D.E., SCHMIDELL, W., NINOW, J.L. *Monascus*: a Reality on the Production and Application of Microbial Pigments. *Appl Biochem Biotechnol*, 178, p. 211–223, 2016a.

VENDRUSCOLO, F., SCHMIDELL, W., MORITZ, D.E., BÜHLER, R.M.M., OLIVEIRA, D., NINOW, J.L. Isoelectric point of amino acid: Importance for *monascus* pigment production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 5, p.179–185, 2016b.

VENKATACHALAM, M., ZELENA, M., CACCIOLA, F., CESLOVA, L., GIRARD-VALENCIENNES, E., CLERC, P., DUGO, P., MONDELLO, L., FOUILLAUD, M., ROTONDO, A., GIUFFRIDA, D., DUFOSSÉ, L. Partial characterization of the pigments produced by the marine-derived fungus *Talaromyces albobiverticillius* 30548. Towards a new fungal red colorant for the food industry. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 67, p. 38-47, 2018a.

VENKATACHALAM, M., MAGALON, H., DUFOSSÉ, L., FOUILLAUD, M. Production of pigments from the tropical marine-derived fungi *Talaromyces albobiverticillius*: New resources for natural red-colored metabolites. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 70, p. 35-48, 2018b.

VENTER, P.B., SENEKAL, N.D., KEMP, G., AMRA-JORDAAN, M., KHAN, P., BONNET, S.L., WESTHUIZEN, J.H. Analysis of commercial proanthocyanidins. Part 3: The chemical composition of wattle (*Acacia mearnsii*) bark extract. *Phytochemistry*, v. 83, p. 153–167, 2012.

WINTER, C., SCHULTZ, M.E.R. e GUTTERRES, M. Evaluation of Polymer Resins and Films Formed by Leather Finishing. *Latin American Applied Research*, v. 45, p. 213-217. 2015.

WU, W.T., WANG, P.M., HUANG, T.K., YUAN, G.F. Method for Cultivation of Filamentous Fungi. Patent. United States Patent, N° US 6,746,862 B1, 2004.

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

ZALIAUSKIENE, A., BELESKA, K., VALEIKA, K., BALCIUNIENE, J., TRICYS, V., VALEIKENE, V. Lime-free unhairing. Part 5: some peculiarities of dyeing lime-free leather. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, v. 90, n. 2, p.73, 2006.

ZHAO, Q., FENG, H., WANG, L. Dyeing properties and color fastness of cellulase-treated flax fabric with extractives from chestnut shell. *J. Clean. Prod.*, v. 80, p. 197-203, 2014.

ZHANG, J., SUN, Z., SUN, P., CHEN, T., CHEN, F. Microalgal carotenoids: beneficial effects and potential in human health. *Food Funct.*, v. 5, p. 413–425, 2014a.

ZHANG, T.Y., WU, Y.H., ZHUANG, L.L., WANG, X.X., HU, H.Y. Screening heterotrophic microalgal strains by using the Biolog method for biofuel production from organic wastewater. *Algal Res.*, v. 6, p. 175-179, 2014b.

ZDHC. ZERO DISCHARGE OF HAZARDOUS CHEMICAL PROGRAMME. Manufacturing Restricted Substances List, v.1.1, 2018.