

MÉTODOS DE MONITORAMENTO PARA CONTROLE EFETIVO DE MICRORGANISMOS

Dr. Luis A. Zugno e Sr. Elton Hurlow
Buckman Laboratories International
Memphis, TN - EUA

Resumo:

Existem muitas técnicas que podem ser utilizadas para o controle de microrganismos durante a produção de couros. Este trabalho vai focar no controle de fungos (mofo). O método mais direto e efetivo para a proteção contra fungos é o uso correto de produtos químicos para controle, ou fungicidas. Somente a adição de fungicidas durante o processo de curtimento não dá garantias de bom desempenho. Muita coisa pode não funcionar como previsto devido aos meios dinâmicos de infecção por fungos, crescimento e as mudanças constantes dos processos de curtimento.

A melhor maneira de assegurar o bom desempenho dos fungicidas é a de adicionar a quantidade certa, de uma formulação adequada, no ponto certo de adição no processo de curtimento e confirmar os resultados esperados por medições também apropriadas. Os testes adequados deverão ser feitos em forma regular como parte de um programa bem estruturado de monitoramento. O monitoramento otimiza o programa de controle de fungos e permite indicar de forma antecipada os problemas em potencial.

Este trabalho irá revisar os tipos de monitoramento e métodos de teste que poderão ser utilizados no controle de fungos. Também fornecerá indicativos de conhecimento especializado e técnicas que são requeridas para resolver problemas relacionados com fungos no curtume.

Como o crescimento de fungos afeta a produção de Couros?

Os fungos são microrganismos heterotróficos e dependem de fontes externas de nutrientes para sobrevivência e crescimento (Fig. 1). No couro, os fungos crescem usando o couro como nutriente. Os fungos secretam enzimas e podem lançá-las para fora de sua estrutura e essas enzimas reagem com o couro quebrando gorduras, proteínas e carboidratos em estruturas menores, que são facilmente metabolizadas pelos fungos. O dano ao couro é causado pelo processo nutricional dos fungos.



Fig. 1: Estrutura típica de um fungo visualizado por Microscópio Eletrônico. ©Buckman Laboratories

O crescimento de fungos (mofo) pode criar pequenos ou grandes danos ao couro. Os efeitos de crescimento de fungos podem variar desde simples manchas até a perda de fibras. Em termos práticos, os danos por fungos podem reduzir substancialmente o preço de venda do couro. Quanto mais extensa a presença de fungos, maior será o dano ao couro. A simples presença de fungos no *wet blue* (ou *wet white*) resulta em um impacto imediato e negativo na qualidade do couro. Adicionalmente à desvalorização física e estética da qualidade do couro, atrasos de produção, custo de retrabalho, o descontentamento de clientes deverá ser adicionado às conseqüências financeiras de um problema de mofo.

Programa de Controle de Fungos

Os fungicidas são produtos químicos comumente usados para o controle de fungos (mofo). Somente um pequeno número de produtos tem tido sucesso comercial na Indústria do Couro. Os fungicidas agem principalmente como inibidores de crescimento de fungos e menos como eliminadores de fungos. A formulação de fungicida é composta de ativos e auxiliares para promover uma melhor distribuição do produto no couro.

Um Programa de Controle de Fungos começa com o uso apropriado de fungicida. O uso efetivo de fungicida envolve a própria seleção de ativos, formulação, quantidade e pontos de adição na formulação de curtimento. São muitos os fatores que podem afetar negativamente o desempenho de um fungicida e entre eles temos o teor de gordura na pele, pH, temperatura, presença de oxidantes, redutores e outros aditivos no banho de curtimento. A seleção correta de ativos, formulação, concentração e ponto de adição irá otimizar o desempenho do fungicida. A outra parte do Programa de Controle de Fungos são as técnicas de monitoramento. O monitoramento é feito principalmente por análises químicas e testes microbiológicos acelerados.

A análise qualitativa e quantitativa de fungicidas é iniciada pela extração de ativos fungicidas do couro. Os fungicidas extraídos do couro são analisados por HPLC, *High Pressure Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Pressão) usando soluções padrões como referência (Fig. 2). Cada ativo tem um tempo de retenção característico em determinadas condições de equipamento e solventes. Equipamentos modernos com amostrador automático podem fazer numerosas análises automaticamente com redução de tempo. As técnicas analíticas avançadas permitem não só a determinação de ativos de fungicida mas outras substâncias químicas, incluindo os produtos de degradação, no caso em que as moléculas de fungicida podem ser afetadas por outras substâncias químicas incompatíveis. O conhecimento do que acontece na molécula do fungicida durante o processo de curtimento, nos permite uma melhor determinação das condições de aplicação e seleção de princípios ativos.



Fig. 2: HPLC usado na determinação de ativos de fungicidas no couro

Os testes microbiológicos acelerados foram desenvolvidos para observar e quantificar o crescimento de fungos no *wet blue* (ou *wet white*) em condições ideais para o crescimento destes microrganismos. Estes testes são uma tentativa de simular o desempenho de fungicidas em condições reais. Nem sempre um bom desempenho em testes acelerados significa uma boa proteção do *wet blue* em condições reais e *vice versa*. Na maioria dos casos existe uma correlação razoável entre testes acelerados e aplicações industriais. Um dos testes acelerados preferidos é o da Câmara Tropical. A Câmara Tropical basicamente é constituída de um tanque com temperatura controlada, com aproximadamente 100% de umidade e altamente contaminado. Os níveis de contaminação de fungos são muito altos, principalmente de esporos no ar. Pedacos de *wet blue* de tamanho mínimo de 5 cm x 10 cm são colocados dentro da Câmara Tropical para avaliar o crescimento de fungos na superfície. Amostras de *wet blue* sem fungicida são totalmente cobertas de fungos após 3 dias de exposição na Câmara Tropical. Amostras de *wet blue* protegidas corretamente deverão resistir no mínimo 4 semanas sem crescimento de fungos. Durante o teste acelerado na Câmara Tropical as amostras de *wet blue* são avaliadas semanalmente e o crescimento de fungos é quantificado como percentagem de área contaminada ou em escala numérica.



Fig. 3: Câmara Tropical

O outro teste microbiológico acelerado é conhecido como plaqueamento ou Teste em Placa Petri, cujo método oficial americano é o ASTM D 4576-01. No plaqueamento, uma amostra de *wet blue* é colocada em uma placa de Petri e sobre a amostra é vertido o meio de cultura apropriado. O meio de cultura deverá estar contaminado por espécies de fungos conhecidas ou nativas. As placas de Petri são incubadas a 26-30°C por certo período e o crescimento de fungos na superfície é avaliado e quantificado semanalmente. A Fig. 4 mostra um teste de plaqueamento típico observado em curtume. A amostra na esquerda (A) mostra fungos na superfície do couro, que tem portanto proteção inadequada. As amostras do centro (B) e da direita (C) não apresentam fungos na superfície. A amostra da direita também mostra uma zona de inibição ao redor da amostra de couro, indicando que o produto pode migrar do couro tratado, o que é uma propriedade indesejável do fungicida.

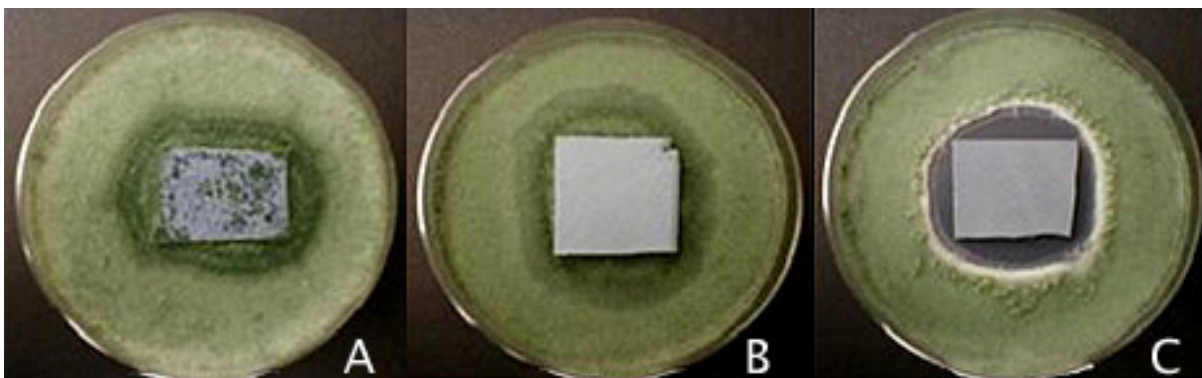


Fig. 4: Três amostras de *wet blue* com diferentes fungicidas submetidas ao teste de placas Petri

O método de Câmara Tropical é muito simples, fácil de ser mantido num curtume e permite que um grande número de amostras sejam simultaneamente testadas e avaliadas com facilidade. O plaqueamento exige o trabalho de um microbiologista e um laboratório de microbiologia. A interpretação de resultados poderá ser mais difícil, já que a cultura está em contato com o couro.

Em nossa experiência mundial, em muitos anos, preferimos trabalhar com a Câmara Tropical. Temos dados suficientes que correlacionam o desempenho da Câmara Tropical com diversas condições de trabalho em diversos locais do mundo.

As técnicas de monitoramento previamente descritas, quando corretamente executadas, em geral são suficientes para assegurar que o *wet blue* está devidamente protegido com um certo nível de segurança. Entretanto, as necessidades de cada curtidor são diferentes em relação ao consumo local de *wet blue*, transporte para o exterior e armazenamento do *wet blue*. Algumas vezes, os fungos se desenvolvem no *wet blue* devido a problemas de embalagens, ou tratamento com fungicida insuficiente ou simplesmente porque novas espécies de fungos estão presentes e a dosagem prescrita de fungicida não é suficiente para controlar aquelas espécies em particular. Os métodos tradicionais de identificação de fungos envolvem, principalmente, o desenvolvimento de culturas, coloração e avaliação com microscópio óptico comparando-se a morfologia de espécies conhecidas. Este procedimento geralmente demora algumas semanas e poucos microbiologistas tem especialização neste campo devido ao grande número de fungos e a complexidade de distinção entre diferentes tipos de fungos. Nem sempre é possível a identificação correta dos fungos.

Nova Tecnologia de Identificação de Fungos

A análise seqüencial de DNA dos fungos permite a identificação correta dos mesmos, com base em seu código genético. Um método comprovado está descrito abaixo e é baseado na análise filogenética da região D2 de uma grande sub-unidade seqüencial genética do RNA ribossomal. Uma pequena amostra do fungo é cultivada e o DNA é extraído da cultura usando-se técnicas de extração especializadas. Após o DNA é amplificado.

A seqüência genética do D2 ribossomal da amostra é gerada usando-se um kit de Sequenciamento para Identificação de Fungos. A análise seqüencial é feita com o auxílio de um software para análise de fungos, e utilizando-se um vasto banco de dados. Quando não é possível localizar o fungo no banco de dados existente, uma nova busca “BLAST” é feita no GenBank (Banco Genético), que é um banco de dados mantido globalmente para pesquisa microbiológica. Este método de análise por seqüência de DNA permite a identificação de fungos com precisão. Resultados repetitivos são obtidos em menos de 24 horas.

Eis um exemplo de trabalho de identificação de fungos a partir de uma amostra de *wet blue* mofado. Neste caso o fungo foi com certeza identificado como *Aspergillus niger*.



Fig. 5: Wet blue mofado



Fig. 6: Visualização do fungo no couro por microscópio óptico. ©Buckman Laboratories

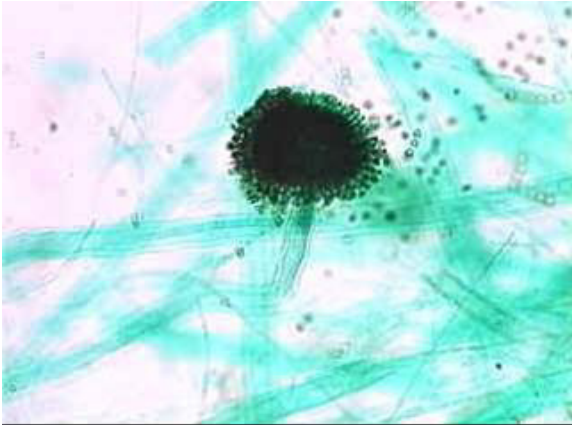


Fig. 7: Visualização do fungo por microscópio óptico e uso de corante ©Buckman Laboratories



Fig. 8: Visualização do fungo por microscópio eletrônico. ©Buckman Laboratories



Fig. 9: Amplificador e sequenciador de DNA

- O teste é não destrutivo;
- A análise pode ser feita com quantidades muito pequenas de produto, da ordem de microgramas;
- As análises são feitas com facilidade comparando-se a área manchada e não manchada;
- A amostra analisada está simultaneamente sendo visualizada pelo Microscópio Eletrônico de Varredura;
- A área do sensor é da ordem de nanômetros, o que facilita a resolução de amostras muito pequenas e permite facilmente a identificação de cristais e partículas sólidas;
- Análises de vários elementos são feitas em poucos minutos.

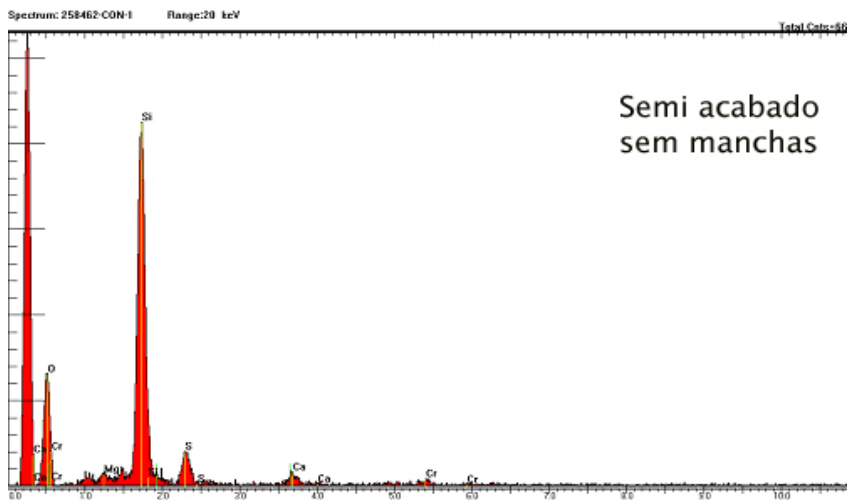
A análise química por via úmida é mais sensível e precisa, mas requer grandes quantidades de material e este deve ser homogêneo. Estas condições não estão presentes nos problemas de manchas nos couros.

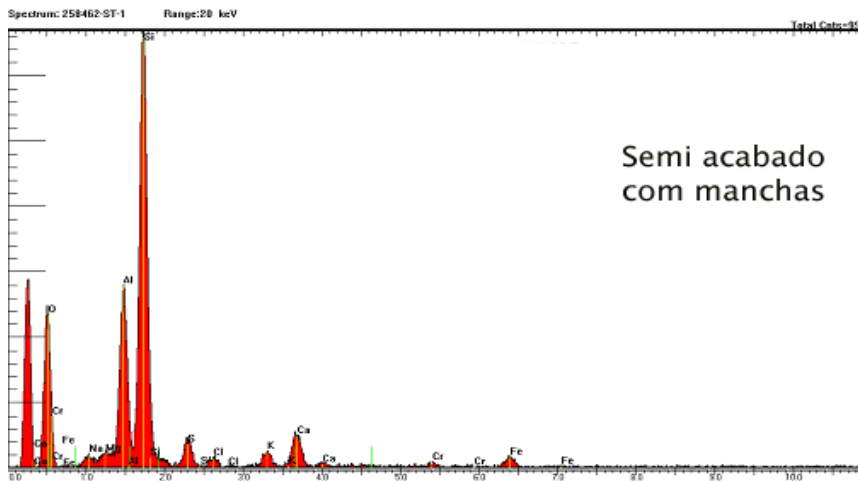
Abaixo está um exemplo de análise feita em couro semi-acabado com e sem manchas, utilizando-se a técnica de Microscópio Eletrônico de Varredura e Espectroscopia de Raios X com Energia Dispersiva (EDX).

Notas:

- 1) A análise é semi-quantitativa e os resultados são normalizados a 100%
- 2) O oxigênio é reportado tipicamente na forma de óxidos elementares. A análise não inclui o carbono.

Composto	Área Sem Manchas %	Área Manchada %
Oxigênio (como O)	43.1	32.6
Magnésio (como Mg)	2.5	1.6
Silício (como Si)	42.7	34.5
Enxofre (como S)	6.7	3.0
Cálcio (como Ca)	2.8	3.8
Cromo (como Cr)	2.2	0.8
Sódio (como Na)		1.6
Alumínio (como Al)		13.4
Cloro (como Cl)		1.0
Potássio (como K)		1.8
Ferro (como Fe)		2.4





Conclusões:

O controle de fungos no meio ambiente dinâmico de produção de couros é um grande desafio. Um programa de controle bem estruturado deve incluir a seleção do fungicida correto, dosado em nível apropriado e no ponto correto do processo, e deverá ter suporte de um programa regular de testes analíticos.

As análises vão confirmar a presença de níveis de substância ativa suficiente na superfície do couro. O desempenho do fungicida é posteriormente confirmado pelo teste microbiológico acelerado. No entanto, na prática até os melhores programas podem ter problemas. Neste momento é que o conhecimento microbiológico, as sofisticadas técnicas analíticas e o conhecimento do processo de curtimento são combinados para identificar as causas dos problemas e resolvê-los.

Os autores agradecem a Maria Aparecida Ferreira e Rita Porto pela revisão do trabalho.