



**UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE CATALUNYA
BARCELONATECH**

TESI DOCTORAL:

**FUNGICIDES ALTERNATIUS PER A LA INDÚSTRIA
DE LA PELL. COMPARACIÓ AMB PRODUCTES
CONVENCIONALS.**

AUTORA: Sara Cuadros Domènech

Els agraïments d'una tesi solen ser per la gent que confia en tu i que t'ajuda a arribar a aquest punt. Durant aquests anys hi han hagut moltes persones implicades en tot aquest enrenou, i a totes elles els agraeixo moltíssim la seva ajuda, tant directa com indirectament.

Hí ha però, persones més implicades que altres i que les seves hores de feina queden aquí també reflectides. Des d'aquí, un agraïment molt especial als meus tres "jefes". Gràcies Àngels per haver cregut sempre en aquesta tesi, abans inclús que ho fos!, i per tot el que m'has ensenyat durant aquest temps. Gràcies Quim per estar sempre al meu costat (mai millor dit, compartint despatx), quan t'he necessitat i quan no. I gràcies Agustí per confiar sempre en mí, sóc molt afortunada d'haver treballat amb tu, un "jefe" com n'hi ha pocs. Vaja, uns cracks!!!

I com no, a la "Family", perquè són al·lucinants, i perquè sempre puc comptar amb ells. Gràcies papa i mama per totes les hores extres de cangur que heu hagut de fer (que no són poques!) per que jo pogués tirar endavant. Gràcies Mari per ajudar-me tant, en això i en tot, gràcies per ser la millor germana que podia desitjar. Gràcies David, Nil i Jana, perquè sou genials!!! Gràcies Josep, per la força que em dones i perquè no has deixat mai de creure en mí. I gràcies Abril, la meva petita reina.

Sense tots vosaltres, això no hagués estat possible.

Aquesta investigació ha estat realitzada amb el recolzament del "Ministerio de Ciencia e Innovación" a través del Projecte Nacional CTQ2009-08347 (Tecnologías limpias en tenería: aplicación de nuevos compuestos fungicidas medioambientalmente sostenibles)

RESUM

Aquesta tesi es basa en la recerca d'alternatives als fungicides convencionalment utilitzats en la indústria adobera. Aquests productes han de ser eficaços enfront un alt nombre de fongs, menys tòxics, més acceptables mediambientalment i atractius econòmicament.

El principal objectiu és avaluar la capacitat antifúngica dels compostos seleccionats (registrats en la Directiva 98/8/CE); diiodometil-p-tolilsulfona, DIMPTS, 3-iodo-2-propinil-N-butilcarbammat, IPBC, tiabendazol, TBZ, i la sal sòdica de dodecil-di(aminoetil)-glicina, TEGO, davant diferents tipus de fongs. Les soques utilitzades formen part de les espècies més comuns en les adoberies: *Aspergillus brasiliensis*, *Trichoderma harzianum*, *Alternaria alternata* i *Penicillium funiculosum*. A part, s'han aïllat tres fongs diferents d'indústries adoberes per poder treballar amb contaminacions reals, espècies més resistents als productes antifúngics habituals. La capacitat antifúngica dels compostos seleccionats s'ha comparat amb els fungicides usats normalment en les adoberies: el 2-(tiocianometiltio)-1,3-benzotiazol, TCMTB, i una barreja de compostos fenòlics (p-cloro-m-cresol, PCMC, i o-fenilfenol, OPP).

Primer s'ha determinat la Concentració Mínima d'Inhibició (CMI) de les molècules seleccionades davant els fongs descrits. Posteriorment, utilitzant pell wet blue per l'estudi, s'ha comparat l'eficàcia dels productes amb diferents ofertes de cadascun d'ells.

Per completar els assajos, s'han aplicat els fungicides escollits en tres processos diferents: un adobament al crom, un píquel de conservació i un greixatge de pell adobada amb extractes vegetals. Sobre la pell obtinguda en cada procés s'han realitzat diverses proves de control de creixement de fongs per avaluar l'eficàcia dels productes, la determinació de la mínima quantitat de producte efectiva i la determinació del fungicida que resta en les diferents capes de la pell. L'avaluació de la toxicitat dels productes associada amb la seva aplicació i la viabilitat econòmica de les alternatives proposades complementen els estudis.

L'elevada capacitat antifúngica demostrada utilitzant dos dels quatre fungicides proposats, el DIMPTS i el IPBC confirmen que són bons candidats per utilitzar-se com a fungicides alternatius en la indústria de la pell. Les pells obtingudes utilitzant aquests dos productes presenten bones

característiques i l'impacte mediambiental és menor ja que la toxicitat de les aigües residuals obtingudes és més baixa que la toxicitat causada per l'aplicació dels productes convencionals.

Paraules clau; *Fungicida, fong, wet blue, píquel de conservació, greixatge vegetal, Concentració Mínima d'Inhibició, toxicitat*

ABSTRACT

This thesis is focused on the search of alternatives to fungicides conventionally used in the tanning industry. These chemicals must be effective against a large number of fungi less toxic, more environmentally friendly and economically attractive.

The main objective is to evaluate the fungicidal capacity of selected alternative compounds (Directive 98/8/CE); diiodometil p-tolylsulfone (DIMPTS), 3-Iodo-2-propynyl butylcarbamate (IPBC), thiabendazole (TBZ) and dodicine clorhydrate (TEGO) versus different types of fungi. The strains used belong to the most common species in tanneries: *Aspergillus brasiliensis*, *Trichoderma harzianum*, *Alternaria alternata* i *Penicillium funiculosum*. In addition, different fungi from real pollution tannery have been isolated from the industry; these are species more resistant to common antifungal chemicals. The antifungal capacity has been compared with selected fungicides normally used in tanneries, such as 2-(thiocianometilthio)-1,3-benzothiazole (TCMTB) and the mixture of phenolic compounds, p-chloro-m-cresol (PCMC) and o-phenylphenol (OPP).

First, the Minimum Inhibition Concentration (MIC) of molecules has been determine against the selected fungi. Subsequently, the effectiveness of different offers of chemicals has been compared using wet blue leather.

To complete the tests, selected fungicides have been applied in three different processes: a chrome tanning process, a preservative pickling process and a fatliquoring process of hides tanned with vegetable extracts. Further studies consisted of a microbiological control of samples inoculated with fungi common in tannery, determination of the minimum effective amount of chemical and determination of the fungicide content on the different layers of the hide. The evaluation of the toxicity of process wastewaters associated with their application and the economic viability of the proposed alternatives complemented the studies.

The higher antifungal capacity of two of the four fungicides proposed, DIMPTS and IPBC, employed in different processes confirms that are good candidates to be used in the leather sector.

Hides obtained using alternative fungicides showed good characteristics, and, from the environmental impact point of view, toxicity from wastewaters was lower for the alternative chemicals against those commonly used.

Keywords → *alternative fungicides, strains of fungi, wet blue, vegetable leather, preservative pickling process, toxicity*

ÍNDEX

RESUM	4
ABSTRACT	6
ÍNDEX	8
CAPÍTOL 1	
JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS	16
1. Justificació	16
2. Objectius	17
2.1. Objectius específics	17
CAPÍTOL 2	
LA PELL. ELS FONGS. ELS FUNGICIDES EN EL PROCÉS D'ADOBAMENT	20
1. El procés d'adobament de la pell	20
1.1. La pell	20
1.2. El procés d'adobament	21
1.2.1. La conservació de la pell en brut	21
1.2.2. El remull	21
1.2.3. El pellam-calciner	21
1.2.4. El descarnat	21
1.2.5. El dividit	22
1.2.6. El descalcinat i rendit	22
1.2.7. El desengreix (o desgreixatge)	22
1.2.8. El píquel	22
1.2.9. L'adobament	23
1.2.9.1. Adobament amb extractes vegetals	23
1.2.9.2. Adobament amb crom i altres metalls	24
1.2.9.3. Altres tipus d'adobament	24
1.2.10. L'escorregut i el rebaixat	25
1.2.11. La neutralització	25
1.2.12. El re-adobament	25
1.2.13. La tintura	25

1.2.14.	El greixatge	26
1.2.15.	L'escorregut, el repassat i l'estirat	26
1.2.16.	L'assecatge	26
1.2.17.	Operacions mecàniques	26
1.2.18.	L'acabat	26
2.	La necessitat d'utilitzar fungicides a les adoberies	27
2.1.	Compostos fungicides per a la pell	28
2.2.	Directiva 98/8/CE	30
3.	Generalitats dels fongs	31
3.1.	Nutrició dels fongs	32
3.2.	Condicions ambientals pel creixement de fongs	33
3.3.	Fongs colonitzadors de substrats especials	34
3.3.1.	El creixement de fongs al cuir	34

CAPÍTOL 3

MATERIAL I MÈTODES	35	
1.	Introducció	35
2.	Material	35
2.1.	Selecció de compostos fungicides	35
2.2.	Selecció de fongs	37
2.3.	Material bàsic de laboratori	38
3.	Instrumentació	39
3.1.	Campana de flux laminar (GLATT Laborotecnic, model H)	39
3.2.	Autoclau (SELECTA Autester E)	39
3.3.	Cromatògraf líquid d'alta resolució - HPLC (WATERS)	39
3.4.	Bombos a escala de laboratori (INOXVIC - Simplex 4)	41
3.5.	Microscopi i lupa	41
3.5.1.	Microscopi òptic (OLYMPUS, model CH)	41
3.5.2.	Microscopi òptic digital (LEICA)	42
3.5.3.	Microscopi estereoscòpic (LEICA)	42
3.6.	Espectrofotòmetre (DATACOLOR 400™)	43
3.7.	Màquina de dividir (FORTUNA, model 620)	43
3.8.	Equip d'assaig amb control UV (Atlas SUNTEST XLS+)	43
3.9.	Càmera climatitzada (ANGLO)	44
3.10.	Molí triturador (Thomas Scientific, WILEY MILL model nº 3)	44
3.11.	Aparell d'ultrasons (SELECTA)	44

3.12.	Espectrofotòmetre UV (PERKIN ELMER, Lambda 25)	45
4.	Mètodes	45
4.1.	Recompte d'espores en suspensió	45
4.1.1.	Recompte directe amb microscopi	46
4.1.2.	Per dilucions i creixement en placa	47
4.1.3.	Exemple d'un recompte de suspensió d'espores de <i>Aspergillus brasiliensis</i>	47
4.2.	Mètode de control de creixement microbiològic	48
4.3.	Determinació de fungicida en pell	50
4.4.	Determinació de la toxicitat de les aigües residuals	52

CAPÍTOL 4

AÏLLAMENT DE FONGS REALS DE FÀBRICA 53

1.	Introducció	53
2.	Objectius	53
3.	Material i reactius	53
4.	Part experimental	54
5.	Resultats	57

CAPÍTOL 5

CONCENTRACIÓ MÍNIMA D'INHIBICIÓ 58

1.	Introducció	58
2.	Objectius	58
3.	Material i reactius	59
4.	Part experimental	61
4.1.	Preparació de diferents dilucions de fungicida	61
4.2.	Preparació i sembra de les plaques	63
4.3.	Lectura de resultats	64
5.	Resultats	64
6.	Conclusions	68

CAPÍTOL 6

APLICACIÓ DE FUNGICIDES SOBRE PELL WET BLUE 70

1.	Introducció	70
2.	Objectius	70
3.	Material i reactius	70
4.	Part experimental	71

4.1.	Preparació d'una pell lliure de bactericides i fungicides _____	71
4.2.	Aplicació de fungicida sobre pell wet blue _____	72
4.2.1.	Oferta del 0.1% - 0.5% - 1% de fungicida _____	73
4.2.2.	Estudi comparatiu amb un 0.2% de fungicida _____	73
5.	Resultats _____	73
5.1.	Oferta del 0.1% - 0.5% - 1% de fungicida _____	74
5.2.	Estudi comparatiu amb un 0.2% de fungicida _____	78
5.2.1.	Resultats enfront l' <i>Aspergillus brasiliensis</i> (CECT 2088) _____	78
5.2.2.	Resultats enfront el <i>Trichoderma harzianum</i> (CECT 2423) _____	80
6.	Conclusions _____	81

CAPÍTOL 7(I)

APLICACIÓ DE FUNGICIDES EN ADOBAMENT AL CROM _____ 82

1.	Introducció _____	82
2.	Objectius _____	82
3.	Material i reactius _____	83
4.	Part experimental _____	84
4.1.	Aplicació de 0.2% de fungicida en bombos de laboratori _____	84
4.1.1.	Control de creixement de fongs sobre la pell adobada al crom _____	85
4.2.	Aplicació de diferents quantitats de fungicida _____	85
4.2.1.	Control de creixement de fongs sobre la pell adobada al crom _____	86
5.	Resultats _____	87
5.1.	Aplicació de 0.2% de fungicida en bombos de laboratori _____	87
5.1.1.	Control de creixement de fongs sobre la pell adobada al crom _____	87
5.2.	Aplicació de diferents quantitats de fungicida _____	91
5.2.1.	Control de creixement de fongs sobre la pell adobada al crom _____	91
6.	Conclusions _____	94

CAPÍTOL 7(II)

APLICACIÓ DE FUNGICIDES EN ADOBAMENT AL CROM _____ 96

1.	Introducció _____	96
2.	Objectius _____	96
3.	Material i reactius _____	96
4.	Part experimental _____	97
4.1.	Procés d'adobament d'una pell vacuna en planta pilot _____	97
4.2.	Control de creixement de fongs sobre la pell wet blue _____	100

4.3.	Característiques organolèptiques de la pell	100
4.4.	Tests físics	100
4.4.1.	Igualació de la tintura	101
4.4.2.	Solidesa a la llum del color del cuir: llum diürna	101
4.4.3.	Solidesa del color del cuir a la gota d'aigua	102
4.4.4.	Solidesa al frec del color del cuir (sec i humit)	102
4.4.5.	Resistències	102
4.4.5.1.	Resistència a l'esquinçament	103
4.4.5.2.	Resistència a la tracció o a l'allargament	103
4.4.5.3.	Resistència a la ruptura de flor	104
4.5.	Determinació de fungicida a la pell	104
5.	Resultats	104
5.1.	Procés d'adobament d'una pell vacuna en planta pilot	104
5.2.	Control de creixement de fongs sobre la pell wet blue	105
5.3.	Característiques organolèptiques de la pell	108
5.4.	Tests físics	108
5.4.1.	Igualació de la tintura	108
5.4.2.	Solidesa a la llum del color del cuir: llum diürna	109
5.4.3.	Solidesa del color del cuir a la gota d'aigua	110
5.4.4.	Solidesa del cuir al frec (sec i humit)	111
5.4.5.	Resistències	111
5.4.5.1.	Resistència a l'esquinçament	111
5.4.5.2.	Resistència a la tracció o a l'allargament	112
5.4.5.3.	Resistència a la ruptura de flor	113
5.5.	Determinació de fungicida a la pell	114
6.	Conclusions	115

CAPÍTOL 8

APLICACIÓ DE FUNGICIDES EN PÍQUEL DE CONSERVACIÓ		117
1.	Introducció	117
2.	Objectius	117
3.	Material i reactius	118
4.	Part experimental	119
4.1.	Efectivitat dels fungicides alternatius en un píquel de conservació	119
4.1.1.	Control de creixement de fongs sobre la pell piquelada	119
4.2.	Aplicació de diferents quantitats de fungicida	120

4.2.1.	Control de creixement de fongs sobre la pell piquelada _____	121
4.3.	Píquel de conservació i emmagatzematge de les pells durant 3 mesos _____	121
4.3.1.	Primera part del procés _____	121
4.3.2.	Segona part del procés _____	122
4.3.3.	Contingut total de fungicida a la pell _____	124
5.	Resultats _____	124
5.1.	Efectivitat dels fungicides alternatius en un píquel de conservació _____	124
5.1.1.	Control de creixement de fongs sobre la pell piquelada _____	124
5.2.	Aplicació de diferents quantitats de fungicida _____	128
5.2.1.	Control de creixement de fongs sobre la pell piquelada _____	128
5.3.	Píquel de conservació i emmagatzematge de les pells durant 3 mesos _____	130
5.3.1.	Contingut total de fungicida a la pell _____	131
6.	Conclusions _____	132

CAPÍTOL 9

APLICACIÓ DE FUNGICIDES EN GREIXATGE VEGETAL _____ 133

1.	Introducció _____	133
2.	Objectius _____	133
3.	Material i reactius _____	133
4.	Part experimental _____	134
4.1.	Greixatge de pell adobada amb extractes vegetals _____	134
4.1.1.	Control de creixement de fongs sobre pell vegetal _____	135
4.1.2.	Contingut total de fungicida a la pell _____	136
4.2.	Aplicació de diferents quantitats de fungicida _____	136
4.2.1.	Control de creixement de fongs sobre la pell vegetal _____	137
5.	Resultats _____	138
5.1.	Greixatge de pell adobada amb extractes vegetals _____	138
5.1.1.	Control de creixement de fongs sobre pell vegetal _____	138
5.1.2.	Contingut total de fungicida a la pell _____	141
5.2.	Aplicació de diferents quantitats de fungicida _____	141
5.2.1.	Control de creixement de fongs sobre la pell vegetal _____	141
6.	Conclusions _____	143

CAPÍTOL 10

DISTRIBUCIÓ ESTRATIGRÀFICA DELS FUNGICIDES A LA PELL _____ 145

1.	Introducció _____	145
----	-------------------	-----

2. Objectius	145
3. Material i reactius	146
4. Part experimental	146
4.1. Pell wet blue	146
4.2. Pell vegetal	147
5. Resultats	150
5.1. Pell wet blue	150
5.2. Pell vegetal	151
5.3. Comparativa de resultats	152
6. Conclusions	154

CAPÍTOL 11

TOXICITAT DE LES AIGÜES RESIDUALS i VIABILITAT ECONÒMICA 155

1. Introducció	155
2. Objectius	155
3. Material i reactius	155
4. Part experimental	156
4.1. Determinació de la toxicitat dels banys residuals	156
4.2. Adobament al crom	157
4.3. Píquel de conservació	157
4.4. Greixatge vegetal	158
5. Resultats	159
5.1. Determinació de la toxicitat dels banys residuals	159
5.2. Adobament al crom	160
5.3. Píquel de conservació	161
5.4. Greixatge vegetal	162
5.5. Comparació de resultats	162
6. Viabilitat econòmica	164
7. Conclusions	165

CAPÍTOL 12

DIFUSIÓ DELS RESULTATS 167

CAPÍTOL 13

CONCLUSIONS FINALS 169

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES 173

ÍNDEX DE TAULES	180
GLOSARI	185
ANNEX A. Rectes de calibratge	187
ANNEX B. Espectres UV de les molècules antifúngiques	190
ANNEX C. Aïllament de fongs reals de fàbrica	192
ANNEX D. Control de creixement de fongs	197
ANNEX E. Contingut total de fungicida a la pell. Estudi de quantitats mínimes	205
ANNEX F. Toxicitat banys residuals	207
ANNEX G. Difusió dels resultats	208

CAPÍTOL 1

JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS

1. Justificació

En els últims anys, els aspectes mediambientals han adquirit una gran importància en la indústria adobera. Els adobers han hagut d'adaptar els seus processos de producció a la legislació mediambiental, cada cop més estricta, tant a nivell nacional com comunitari. A més, el desenvolupament tecnològic actual demanda la implementació de nous processos de fabricació més rentables econòmicament i més respectuosos amb el medi ambient amb l'objectiu final d'aconseguir un desenvolupament més sostenible.

Per tant, és necessari per a la indústria adobera buscar alternatives menys contaminants amb la finalitat de que els seus processos de fabricació compleixin amb els límits mediambientals actualment existents.

En la fabricació del cuir, tant les pells adobades com les no adobades corren el risc de ser atacades per una gran varietat de microorganismes. Els processos de les adoberies ofereixen moltes possibilitats de creixement microbià: processat de pells fresques, ús d'enzims, emulsions greixoses i ús de productes naturals per operacions d'adobament i d'acabat. Altres factors com l'emmagatzematge perllongat i el transport de les pells en estat humit incrementen les possibilitats de creixement microbià.

Tan aviat com la pell s'extreu de l'animal, és atacada per bacteries que es multipliquen ràpidament, arribant-se a provocar la digestió total de la pell pels enzims produïts, a menys que s'apliqui algun procediment de conservació junt amb l'addició d'algun producte bactericida. Per tant, aquesta pell crua s'haurà de protegir de l'atac de bacteries a les operacions d'emmagatzematge i remull.

A part, les pells subjectes als corresponents processos de producció, com píquel, adob, tintura i greixatge són susceptibles a l'atac de fongs. La temperatura, el pH i la humitat confereixen les condicions òptimes pel desenvolupament d'aquests microorganismes. La contaminació per

fongs a la pell es manifesta per aparició de taques normalment de caràcter permanent, així com per una disminució de les propietats físiques degut a la degradació del col·lagen. Per aquestes pells, és necessària l'addició d'un fungicida efectiu per evitar el creixement de fongs.

Actualment, les adoberies disposen de pràcticament els mateixos compostos fungicides que fa varies dècades, els quals tenen un espectre d'aplicació limitat o són responsables d'un nivell de contaminació notori. La recerca de fungicides alternatius eficaços en aquestes operacions és el tema en que es basa aquesta tesi. Alternatives que siguin menys tòxiques, més acceptables mediambientalment, eficients davant un major número d'espècies de fongs i sostenibles econòmicament.

2. Objectius

L'objectiu principal d'aquesta tesi és la recerca de nous sistemes fungicides com alternatives als productes convencionalment utilitzats en la indústria adobera i que compleixin els requisits desitjats. Les principals exigències que es demanen a un producte d'aquestes característiques és una alta eficàcia davant un màxim nombre d'espècies, baixa toxicitat, que sigui més acceptable mediambientalment i admissible econòmicament.

En aquest treball se seleccionaran diferents compostos fungicides (registrats a la Directiva 98/8/CE) i s'haurà d'avaluar la seva capacitat antifúngica enfront diferents soques de fongs. La capacitat fungicida dels compostos escollits es compararà amb la capacitat dels fungicides convencionalment utilitzats a les adoberies, així com el 2-(tiocianometiltio)-1,3-benzotiazol (TCMTB) i una barreja de compostos fenòlics (p-cloro-m-cresol, PCMC, i o-fenilfenol, OPP).

2.1. Objectius específics

Per aconseguir l'objectiu principal, s'han d'assolir una sèrie d'objectius específics:

- Seleccionar compostos fungicides de contrastada eficàcia en altres sectors que per les seves propietats es dedueix que puguin tenir aplicació a la indústria adobera. Tots ells seran compostos notificats i registrats a la Directiva 98/8/CE.
- Avaluar la capacitat fungicida dels compostos seleccionats respecte diferents soques de fongs i comparar-la amb dos fungicides utilitzats actualment.

- Seleccionar diferents fongs comuns a les adoberies per poder estudiar el seu comportament davant els fungicides seleccionats.
- Aïllar i identificar fongs de fàbriques adoberes per poder treballar directament amb soques reals i que hagin sobreviscut als fungicides utilitzats habitualment.
- Determinar la Concentració Mínima d'Inhibició (CMI) de les molècules antifúngiques seleccionades respecte aquests tipus de fongs.
- Afegir els diferents fungicides escollits en tres tipus de processos: adobament al crom, píquel de conservació i greixatge vegetal (a escala de laboratori). Avaluar la seva capacitat antifúngica amb un control de creixement microbiològic i comparar els resultats amb els fungicides convencionals.
- Realitzar un procés d'adobament al crom fins a tintura i greixatge d'una pell en planta pilot utilitzant els fungicides proposats com alternatius. A la pell resultant realitzar un control microbiològic de creixement de fongs i analitzar les seves propietats físiques.
- Realitzar un píquel de conservació amb els diferents fungicides i mantenir les pells emmagatzemades durant tres mesos simulant les condicions reals. Transcorregut aquest temps continuar amb el procés. Determinar el contingut de fungicida abans d'emmagatzemar, després de l'emmagatzematge i un cop acabat el procés de tintura i greixatge.
- Afegir diferents percentatges de fungicides a la pell per determinar quina és la mínima quantitat de producte necessari per evitar el creixement d'aquest tipus de microorganismes a la pell. Assajos pels tres tipus de processos estudiats: un adobament al crom, un píquel de conservació i un greixatge vegetal.
- Analitzar el contingut de fungicida restant a la pell, tant per pell wet blue com per vegetal. La determinació dels fungicides al cuir es realitzarà estratigràficament, d'aquesta manera s'estudiarà la difusió i la fixació dels diferents compostos antifúngics en les capes de la pell: flor, intermitja i carn.

- Avaluar l'impacte mediambiental de les aigües residuals procedents de les operacions a les que se'ls han afegit els nous compostos fungicides. Comparar amb l'impacte dels altres tractaments convencionals (TCMTB i barreja de compostos fenòlics).
- Realitzar un estudi econòmic del que suposaria treballar amb els fungicides alternatius proposats o amb els productes utilitzats fins ara.

CAPÍTOL 2

LA PELL. ELS FONGS. ELS FUNGICIDES EN EL PROCÉS D'ADOBAMENT

1. El procés d'adobament de la pell

1.1. La pell

La pell és un subproducte dels escorxadors. És un producte putrescible i per tal d'evitar-ho s'ha d'adobar. El procés d'adobar la pell consisteix a fer-li un tractament per a conservar-la i donar-li així unes propietats adequades segons per a que es vulgui destinar el cuir. (Enrich 1999) (Bacardit et al. 2009)

La pell està formada per tres capes ben diferenciades; l'epidermis, la dermis i el teixit subcutani o hipodermis. La part que interessa a l'adobar és la dermis, la resta és eliminada en els primers processos d'adobament. (Figura 2.1)

La dermis està constituïda fonamentalment per fibres d'una proteïna anomenada col·lagen, però també conté fibres elàstiques, reticulina, vasos sanguinis, nervis, cèl·lules grasses i teixit muscular. La composició percentual d'aquests components varia estratigràficament de la capa superior, o capa flor, fins a la inferior, o capa carn. L'estructura del col·lagen varia també entre les diferents espècies d'animals i dins de cada espècie segons l'edat, la procedència, ... (Morera 2002)

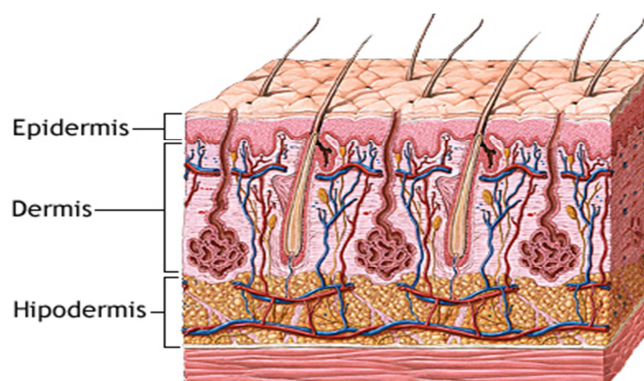


Figura 2.1. Estructura de la pell (Font: Adam 2011)

1.2. El procés d'adobament

Una vegada extreta la pell de l'animal, després d'una neteja inicial, resulta obligat donar a les pells algun tractament que les estabilitzi. Aquesta estabilització és el que s'anomena "adobament". (Adzet 1995)

1.2.1. La conservació de la pell en brut

Quan l'animal és sacrificat a l'escorxador, es separa la pell de la resta del cos i, fins que la pell no arriba a mans de l'adober, se li apliquen una sèrie de tractaments que permeten la seva conservació temporal. Els tractaments més habituals són l'assecatge i el salat. El que busquen aquests tractaments és la no proliferació de microorganismes. (Morera 2002)

1.2.2. El remull

El remull és un tractament de la pell en brut amb aigua i persegueix la humectació i la neteja de la pell de sang, microorganismes, limfes, globulines, albúmines i productes de conservació addicionats anteriorment. S'acostuma a realitzar en diversos banys i en bombos.

Els productes més comuns que se li afegeixen al remull són: agents humectants i tensioactius, productes basificants, sals neutres i enzims, i antisèptics. Aquests últims per evitar el creixement microbià en el remull. (Morera 2002)

1.2.3. El pellam-calciner

El pellam consisteix en l'eliminació de la dermis i el pèl de la pell, sempre i quan no interressi conservar-lo. El calciner s'encarrega d'hidrolitzar les proteïnes per produir un afluirament de l'estructura fibrosa del col·lagen, així com buidar la pell. (Morera 2002)

1.2.4. El descarnat

El principal objectiu d'aquesta operació és la neteja de la pell eliminant el teixit subcutani i adipós. Aquests teixits s'han de treure a les primeres etapes de la fabricació amb la finalitat de facilitar la penetració dels productes químics aplicats en fases posteriors i obtenir un gruix el més regular possible. (Soler 2000)

1.2.5. El dividit

Quan la pell és massa gruixuda per l'article final desitjat es passa per una màquina que divideix la pell en dues, de manera que el costat "flor" queda igualat a un gruix previ seleccionat i separat del costat "carn", que és el que es denominarà *serratge*. (Morera 2002)

1.2.6. El descalcinat i rendit

Abans de passar a l'etapa d'adobament té lloc el descalcinat i rendit, que consisteix en eliminar les restes de substàncies alcalines o d'enzims introduïts en el procés de pellam-calciner, i en tractar les pells amb enzims pancreàtics o vegetals per tal d'afluixar l'estructura de la pell i així aconseguir més flexibilitat i suavitat. (Allué et al. 2002)

1.2.7. El desengreix (o desgreixatge)

Aquesta operació es realitza només per aquelles pells amb més contingut de greix, així com ovines i porcines. Consisteix en eliminar part d'aquest greix natural per evitar que pugui provocar una menor penetració de productes, taques fosques a la pell i altres defectes no desitjats. (Morera 2002)

1.2.8. El píquel

En el procés de píquel les pells són tractades amb solucions salines i àcides en el mateix bany fins deixar la pell a pH entre 2 i 3.5. El pH àcid atura l'acció dels enzims del rendit i protegeix la pell de l'acció bacteriana. (Font 2002)

Els productes més utilitzats són àcid fòrmic, àcid sulfúric i clorur sòdic. Segons les quantitat afegides es distingiran diferents tractaments de píquel.

La realització d'un píquel fort o de conservació (pH 1-1.5) també és un mètode per conservar les pells durant un període prolongat de temps. (Morera 2002)

Es pot realitzar també, un píquel de conservació per vendre o emmagatzemar les pells amb una temperatura per sota de 20°C, o bé per deixar-les reposar després del desengreix. (Soler 2000) Aquest és un dels punts del procés en que es fa necessari l'addició d'algun producte antifúngic per a que les pells puguin romandre durant mesos sense patir l'atac de fongs.

Les condicions ambientals on s'emmagatzemen o es transporten, junt amb la resistència, cada vegada major, d'aquests microorganismes, fan que sigui imprescindible afegir algun tipus de fungicida durant la realització del píquel de conservació.

1.2.9. L'adobament

L'adobament de la pell té com a objectiu principal aconseguir una estabilització del col·lagen respecte els fenòmens hidrolítics causats per l'aigua i/o enzims, a més de donar a la pell una resistència a la temperatura superior a la que ja té en estat natural. A més, es pretén aconseguir la creació d'un suport adequat per a que les operacions posteriors puguin tenir l'efecte que els correspon.

Això s'aconsegueix provocant la reacció del col·lagen amb algun producte que sigui capaç de propiciar-la. La reacció serà diferent segons el producte adobant utilitzat. (Morera 2002)

1.2.9.1. Adobament amb extractes vegetals

A les plantes existeixen els tanins, continguts en major o menor quantitat a les diverses parts de la planta, i els no tanins (tanins de pes molecular molt menor). Els tanins són barreges de gran complexitat formades per polifenols d'alt pes molecular, combinats amb hidrats de carboni en moltes plantes, i són els encarregats d'adobar la pell. Els no tanins no adoben però intervenen en l'adobament com a dispersants.

Actualment s'extreuen aquests productes químicament de les plantes que contenen major contingut tànnic, obtenint extractes de castanyer, quebratxo, tara i mimosa, principalment.

L'adobament amb extractes vegetals serveix per certs tipus de pells per sabates, i principalment per sola, folres, plantilles i marroquineria. (Morera 2002)

Els extractes aquosos citats, un cop concentrats, es troben en el mercat en forma de líquids o sòlids amb concentracions de tanins elevades, quasi sempre superiors al 50%. La resta els constitueixen els no tanins, els insolubles i l'aigua fonamentalment. (Soler 2000)

Després d'un adobament amb extractes vegetals, es realitza el greixatge de la pell, i és en aquest punt del procés que existeix la necessitat d'utilitzar fungicides, ja que la pell en aquest estat pot romandre un màxim de dues o tres setmanes esperant continuar amb el procediment. La pell adobada amb extractes vegetals i a la que se li ha realitzat el greixatge posterior, és un nutrient

ideal pels fongs, i junt amb les condicions ambientals de les adoberies, fan que aquest tipus de producte resulti idoni per ser atacat per aquests microorganismes.

1.2.9.2. Adobament amb crom i altres metalls

Els productes químics que més s'utilitzen per l'adobament són bàsicament dos; el crom i l'alumini, encara que existeixen altres que també posseeixen la capacitat d'adobar. (Soler 2000)

Els productes adobants més importants que subministra la indústria química són les sals de crom III, el més freqüent és el sulfat monobàsic de crom III. S'utilitzen les sals de crom molt més que les d'altres metalls perquè fins al moment són el producte més assequible que es coneix que pugui proporcionar un bon poder adobant (poder de formar enllaços estables amb el col·lagen). Faciliten una base a la pell suficientment apte per poder aconseguir les qualitats que el mercat requereix als articles de cuir.

Actualment, l'adobament de les pells es realitza amb sals de crom pels articles de confecció (napa i pell girada) i per la major part del cuir per sabates i tapisseria. (Morera 2002)

La pell adobada al crom, en estat humit, abans de continuar amb el procés, s'anomena "wet blue". En aquest estat es poden guardar i comercialitzar les pells, procurant que no s'assequin, sempre i quan s'hi hagi realitzat un tractament amb fungicides durant l'adobament, ja que aquest tipus de pells proporcionen les condicions òptimes pel desenvolupament d'aquest tipus de microorganismes.

Les sals d'alumini també s'utilitzen en forma de sulfat d'alumini. Aquestes sals, però, no proporcionen gran resistència a l'aigua ni a la temperatura. La seva major aplicació és en pelleteria. Amb una actuació semblant també es troben el ferro III, el zirconi i el titani, amb un ús molt limitat. (Morera 2002)

1.2.9.3. Altres tipus d'adobament

Altres productes aptes per l'adobament de pells són els aldehids, els olis de peixos oxidables, resines d'urea, melanina, acríliques,... Tots aquests amb un ús més limitat i utilitzats generalment com a complements de l'adobament al crom.

1.2.10. L'escorregut i el rebaixat

L'escorregut i el rebaixat són dues operacions mecàniques que consisteixen en eliminar el bany residual restant a la pell i les rebaixadures, respectivament, per regular i igualar la diferència de gruix que hi pugui haver en diferents parts d'una mateixa pell. (Morera 2002)

1.2.11. La neutralització

L'objectiu principal de la neutralització és l'eliminació de les sals, de les sals de crom no fixades i dels àcids forts que conté el cuir, o bé, canviar aquests per àcids orgànics. Això es fa amb un rentat i una posterior addició de sals alcalines. Un rentat final eliminarà les sals formades a la neutralització. (Morera 2002)

En el cas de l'adobament amb extractes vegetals no és necessari neutralitzar, ja que en el procés d'adobament no s'han utilitzat àcids forts que puguin perjudicar la seva resistència, i la càrrega iònica que posseeix la pell vegetal és ideal per l'addició dels productes aniònics posteriors. (Soler 2000)

1.2.12. El re-adobament

En aquesta operació s'intenten modificar certes propietats del cuir en funció de l'article que es desitja aconseguir, així com el tacte, la fermesa, la tintura, la resistència a la suor,... Depenent de l'adobament que s'ha realitzat i del que es vol aconseguir, s'escollirà amb quins productes es vol realitzar el re-adobament. (Morera 2002)

1.2.13. La tintura

Aquesta operació serveix per canviar el color que té el cuir degut als productes adobants. El color obtingut després de tenyir es pot modificar en el greixatge, depenent del producte final desitjat, encara que normalment el color final s'aconsegueix amb l'acabat. La tintura ha de buscar el color el més semblant possible al final.

La tintura pot ser travessada o no, depenent del que interressi aconseguir. Això dependrà del tipus de colorant, productes auxiliars utilitzats, concentracions, temperatura, pH, ... L'important és que el colorant quedi ben fixat al cuir. (Morera 2002)

1.2.14. El greixatge

L'objectiu del greixatge és evitar que quan el cuir s'assequi, quedi dur i per tant els olis han d'actuar com l'aigua que conté quan el cuir està moll. A l'assecat, les fibres de col·lagen de la pell tenen tendència a unir-se unes amb les altres, fet que es pronúncia com més a prop o en tensió estiguin i la temperatura sigui major. Per tant, la missió dels olis (que poden ser d'origen animal, vegetal, mineral o de síntesis) és mantenir les fibres separades i lubricades. (Soler 2000)

1.2.15. L'escorregut, el repassat i l'estirat

L'escorregut és una operació mecànica que es realitza per eliminar l'excés d'aigua a la pell i per deixar el cuir completament pla i sense arrugues, augmentant al màxim la seva superfície.

El repassat i estirat deixa més llis el gra de la flor, aplanar el cuir i elimina les marques que pot haver ocasionat la màquina d'escórrer. Aquesta operació també pot augmentar la superfície. (Morera 2002)

1.2.16. L'assecatge

L'objectiu de l'assecatge és evaporar l'aigua que contenen els cuirs. Aquesta operació influeix sobre les característiques del cuir acabat, i segons el tipus d'adobament i el producte final desitjat, es triarà el sistema d'assecat. (Bacardit et al. 2009)

1.2.17. Operacions mecàniques

Són operacions prèvies a l'acabat que poden variar segons l'article final que es vulgui aconseguir: condicionat, estovat, assecatge final, esmerilat, desempolsat i batanat. Aquesta última consisteix en fer girar els cuirs en sec dins un bombo, proporcionant major flexibilitat i al mateix temps fent pujar el to de color. (Morera 2002)

1.2.18. L'acabat

L'acabat són un conjunt d'operacions basades en el tractament superficial del cuir per donar-li l'aspecte final amb el que es vol comercialitzar. Per tant, l'acabat influeix sobre l'aspecte visual, el tacte i les propietats físiques del cuir. (Bacardit et al. 2009)

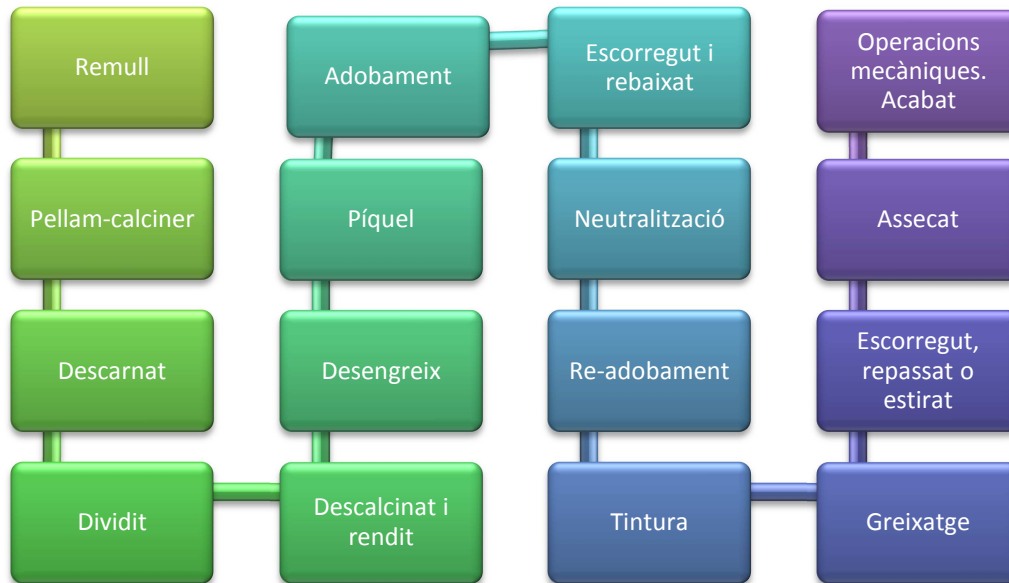


Figura 2.2. Esquema general del procés d'adobament de la pell

2. La necessitat d'utilitzar fungicides a les adoberies

Tot i que és després de les operacions d'acabat que el cuir està en condicions de passar de l'adober al client, existeixen diferents etapes dins del procés en que la pell pot romandre emmagatzemada o transportada.

Aquesta necessitat actual de transportar o emmagatzemar la pell semi processada durant llargs períodes abans no es continuï amb la producció és perillosa per l'atac de microorganismes. (Hauber 2005) La pell en cru s'ha de protegir durant l'emmagatzematge i el remull contra l'atac bacterià. Les pells piquelades, adobades, tenyides o greixades necessiten antifúngic per evitar el desenvolupament de fongs. (Orlita 2004)

Des de que es coneix que els fongs prefereixen una contaminació àcida, els estats que segueixen al píquel i que són els més susceptibles de patir contaminació per fongs són: (Van Deren et al. 1978)

- Pells piquelades
- Pells adobades al crom (wet blue)
- Pells tenyides (humides)
- Pells adobades al vegetal
- Licors adobants vegetals



Imatge 2.1. *Trichoderma harzianum* sobre placa amb medi de cultiu i una mostra de pell wet blue

Les pells que són atacades per fongs s'evidencien per la presència de taques permanents i danys a les propietats físiques a causa de la degradació del col·lagen. A mode general, es pot resumir que les condicions òptimes pel creixement d'un gran nombre de fongs es caracteritzen per un rang de pH entre neutre i lleugerament àcid (3-6), una temperatura de 25°C i una humitat ambiental entre 12 i 15%. La pell wet blue proporciona les condicions òptimes pel creixement de fongs: temperatura d'emmagatzematge, pH àcid, presència d'aigua, proteïnes i greixos. Les espores dels fongs sobreviuen en medi sec, desenvolupant-se al recuperar les condicions òptimes. (Seguer et al. 2002)

D'acord amb Hauber (2008), per a que un producte sigui efectiu com a fungicida, són necessaris els següents requeriments: activitat òptima enfront un alt nombre de fongs, compatibilitat amb la pell i amb els productes químics usats en el procés d'adobament, efectivitat a pH àcid, estabilitat respecte a la temperatura i a la llum UV, baixa solubilitat en aigua, baixa toxicitat en humans i acceptable econòmica i mediambientalment.

Els fungicides adients han de presentar les propietats químiques i físiques adequades que els permetin penetrar a la pell i resistir posteriors rentats, de manera que sempre hi resti producte en la superfície de la pell. (Hauber 2005)

La protecció fungicida de la pell és un tema complex ja que s'ha d'assolir un equilibri entre l'eficàcia del producte i els seus efectes respecte a la salut dels operaris que el manipulen i dels usuaris d'articles manufacturats amb la pell, i també respecte als abocaments i emissions al medi ambient.

2.1. Compostos fungicides per a la pell

Cap als anys 80, els fungicides que predominaven en el sector de la pell es basaven principalment en fenols clorats. Des de que es va retirar el pentaclorofenol (PCP) com a principal antifúngic per prevenir els atacs dels fongs degut al perill de les dioxines que es podien formar per incineració dels residus dels objectes de consum que en contenien, s'han ofert diferents productes alternatius. Aquestes alternatives es presenten amb una càrrega contaminant molt menor, però són productes menys efectius que el PCP. (Hauber and Germann 1997)

El 2-(tiocianometiltio)-1,3-benzotiazol (TCMTB) va esdevenir com a fungicida innovador cap als anys 70, i encara persisteix actualment. Però la legislació mediambiental, cada vegada més estricta, fa que es continuïn buscant alternatives a aquest producte. (Dalton 2008)

El TCMTB té una elevada activitat antifúngica, però posseeix alguns desavantatges. La composició de la seva molècula el fan responsable de causar toxicitat en humans i a nivell mediambiental. (Lindner and Neuber 1990)

Els fungicides més importants i més coneguts per utilitzar en la indústria de la pell fins al moment són els nombrats en la Taula 2.1: (Adminis et al. 2001, Hauber 2008)

Compostos fenòlics:	PCMC	p-cloro-m-cresol
	OPP	o-fenilfenol
	TCP	2,4,6-triclorofenol
Compostos heterocíclics:	TCMTB	2-(tiocianometiltio)-1,3-benzotiazol
	OIT	2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona
	BMC	2-benzimidazolil-metilcarbamat
	MBT	2-mercaptobenzotiazol
	P	Piritiona de sodi
Altres:	DIMPTS	diiodometil-p-tolilsulfona

Taula 2.1. Fungicides més importants i més coneguts utilitzats en la indústria de la pell (Adminis et al. 2001, Hauber 2008)

Diferents consultes amb directors tècnics d'algunes de les principals indústries adoberes espanyoles realitzades l'any 2010 confirmen que els fungicides més utilitzats actualment són el TCMTB, PCMC, OPP, OIT i MBT.

Segons Hauber (2005), la tria d'un tipus de fungicida determinat està influenciada per diferents factors. Alguns d'ells són altament hidrofòbics i, per tant, s'absorbeixen ràpidament a la pell només pel contacte. Altres factors decisius poden ser:

- La distribució del producte dins la pell pot esdevenir molt important a l'hora d'avaluar el nivell de protecció del producte.
- La combinació de diferents fungicides per augmentar les propietats antifúngiques davant un nombre major d'espècies.
- La quantitat de fungicida s'hauria d'afegir en diferents dosis.
- El temps d'aplicació pot arribar a millorar la penetració del producte en pell wet blue.

D'acord amb aquests requeriments, s'han realitzat diferents estudis per trobar els productes més adequats per les adoberies. Yapici i Karaboz (1997) van estudiar l'eficàcia del TCMTB i una

barreja de compostos fenòlics lliures de pentaclorofenol, utilitzant diferents espècies de fongs comuns a la pell, així com *Aspergillus brasiliensis* i *Alternaria alternata*. Els resultats mostraven una eficàcia major del TCMTB que de la barreja provada, en concentracions inferiors de producte.

Bayramoglu (2007) plantejava la possibilitat d'utilitzar productes naturals com a fungicides per a la pell. Els olis essencials, en aquest cas, de l'orenga ofereixen activitat antimicrobiana, que en el treball desenvolupat es va comparar amb fungicides més comuns com el TCMTB i el N-octil-isotiazolinona (N-OITZ). Es va estudiar l'efecte usant fongs comuns en adoberies i els resultats van ser molt satisfactoris.

Un altre treball de Bayramoglu (2006) va estudiar l'efectivitat del TCMTB i del N-OITZ en processos d'adobament al crom i de píquel, davant un nombre de fongs comuns en la pell. Els resultats van concloure que, tot i l'elevada activitat antifúngica que presentaven, els productes no eren efectius enfront el 100% dels fongs escollits.

Tot i que s'ha proposat i investigat un gran nombre de compostos que compleixen en més o menys mesura aquests requeriments, el TCMTB és el que posseeix un ventall més ampli d'aplicació i és el que ha assolit el nivell més alt d'ús en la indústria de la pell. No obstant, les seves limitacions tècniques i el considerable impacte mediambiental de la molècula reforcen la necessitat de buscar nous fungicides per substituir els usats convencionalment.

2.2. Directiva 98/8/CE

Els fungicides estudiats en aquesta tesi es van seleccionar d'acord amb la Directiva 98/8/CE, relativa a la comercialització de biocides. A través d'aquesta directiva, la Unió Europea ha establert un marc normatiu per la comercialització de biocides per tal de minimitzar els riscos per a la salut i el medi ambient, i el correcte funcionament del mercat comú. En una primera fase la Directiva estableix l'obligatorietat d'identificar i notificar les possibles substàncies actives per ser usades en productes biocides. En una segona fase de desenvolupament, la Directiva contempla l'avaluació de les substàncies anomenades mitjançant la realització d'estudis toxicològics i assajos d'eficàcia abans de ser aprovades definitivament per a que puguin ser comercialitzades. (Seguer i Beltrán 2003)

Per fer els estudis de la tesi es van escollir els sis compostos anomenats a la Taula 2.2:

Nom	Sigles	Proveïdor
2-(tiocianometiltio)-1,3-benzotiazol	TCMTB	Lamirsa
p-cloro-m-cresol i o-fenilfenol	PCMC + OPP	Lanxess
Diodometil-p-tolilsulfona	DIMPTS	Dow Chemicals
3-iodo-2-propinil-N-butylcarbammat	IPBC	Lanxess / Dow
Tiabendazol	TBZ	Tecnidex
Sal sòdica de dodecil-di(aminoetil)-glicina	TEGO	Johnson Diversey

Taula 2.2. Compostos fungicides seleccionats per fer l'estudi

El TCMTB i la barreja de compostos fenòlics (PCMC + OPP) s'han utilitzat com a referència respecte el DIMPTS, el IPBC, el TBZ, i el TEGO proposats com a productes alternatius en el sector de la pell.

El DIMPTS és alguicida, bactericida i fungicida. S'utilitza com a conservant de materials en pintures, revestiments de tubs d'aire, recobriments ignífugs, dispersions de pigments, tintes, emulsions, adhesius, massilles, segelladores, gomes, plàstics, tèxtils, producció de paper per protegir la polpa, cartró, i com a conservant de la fusta. (EPA 2008)

El camp d'aplicació actual del IPBC comprèn principalment la protecció de la fusta, adhesius, plàstics, recobriments de paper, tèxtil, tintes i fluids per treballar el metall. Inclús està acceptat com a conservant en cosmètica per a la protecció davant els llevats. (Paulus 2005) L'IPBC també s'aplica a la calefacció, ventilació i conductes d'aire condicionat i equips de control (EPA 1997)

Estudis anteriors (Padoan 2006) ja havien proposat el IPBC com a component d'una barreja antifúngica efectiva. El seu ampli rang d'aplicació i la baixa solubilitat en aigua són dues de les avantatges que el caracteritzen.

3. Generalitats dels fongs

Els fongs pertanyen al major grup de microorganismes responsables de la degradació de biopolímers i altres materials orgànics.

Els fongs són organismes del domini Eucarya (eucariotes, amb el nucli diferenciat) que es classifiquen en un grup a part dels vegetals i dels animals, el regne dels *Fungi*. Típicament, el seu cos vegetatiu està constituït per tubs filamentosos multinuclears anomenats hifes, a través dels quals absorbeixen l'aigua i les substàncies que necessiten pel seu nodriment. El conjunt d'hifes forma el miceli. A les parets cel·lulars es troba la quinina, substància similar a l'exosquelet dels insectes. (Muntañola 1997)

Tots els fongs són heteròtrofs, és a dir, requereixen matèria orgànica preformada que utilitzen com a font d'energia i de carboni per a la síntesis d'estructures cel·lulars per l'obtenció d'energia. Degut a la rígida paret cel·lular, no poden fagocitar l'aliment, més aviat absorbeixen nutrients simples solubles.

Els fongs es reproduïxen tant sexual com asexualment però, en qualsevol cas, formen espores com a producte final. Les espores difereixen molt en mida i forma, però es diferencien fonamentalment de les llavors de les plantes perquè no contenen un embrió preformat. (Deacon 1990)

3.1. Nutrició dels fongs

Els fongs tenen una forma de nutrició característica i altament exitosa. Requereixen compostos orgànics preformats com a fonts d'energia i de carboni per la biosíntesis. Les molècules orgàniques més simples, com monosacàrids, aminoàcids i àcids orgànics, són transportades a través de la membrana cel·lular. En canvi, les molècules més complexes (polímers) que inclouen molts disacàrids, s'han de degradar a monòmers a l'exterior de la cèl·lula mitjançant exo-enzims alliberats a través de les parets o units a aquestes.

A continuació s'enumeren algunes conseqüències d'aquest tipus d'alimentació:

- A causa de la digestió externa que es produeix, els productes de degradació dels polímers queden potencialment disponibles per altres microorganismes presents.
- Per la difusió d'enzims i nutrients, es requereix d'una pel·lícula d'aigua, això fa que el creixement de fongs es limiti a medis relativament humits en els que hi hagi una fase líquida.
- Els fongs que degraden polímers insolubles produeixen zones d'erosió enzimàtica o zones d'esgotament de substrat al voltant de les hifes. Així que han de créixer contínuament a mida que decreix la seva eficiència cap a noves zones per obtenir nutrients.

Els carbohidrats d'origen vegetal constitueixen la font d'energia més abundant pels fongs de la natura. Quasi tots els fongs utilitzen glucosa, i la majoria utilitzen maltosa, sacarosa i midó. (Daecon 1990)

3.2. Condicions ambientals pel creixement de fongs

Hi ha quatre generalitats importants a tenir en compte sobre les condicions del creixement de fongs: (Deacon 1990)

- És més difícil el creixement que a la supervivència. En certa mesura, tots els organismes sobreviuen en condicions que no permeten creixement.
- La producció d'espores sovint requereix menys condicions que les que necessita el creixement.
- Els fongs poden tolerar un factor extrem o un desfavorable sempre i quan tota la resta estiguin pròxims al punt òptim.
- Els resultats obtinguts d'un organisme en cultiu pur no necessàriament s'apliquen als medis naturals, on existeixen altres organismes.

Els factors més importants pel creixement i desenvolupament de fongs són:

▪ **Temperatura**

La majoria de fongs creixen a temperatures moderades en un interval de 10 a 40°C, estant la temperatura òptima entre 25 i 35°C. Tot i així, dins d'aquesta categoria existeixen diferències de comportament.

▪ **Concentració de ions hidrogen (pH)**

És difícil generalitzar en aquest tema ja que les respostes dels fongs al pH estan afectades, en gran mesura, per altres factors no relacionats. En el laboratori, molts fongs creixen en un interval de pH de 4.5 a 8.0 i mostren un ampli interval de pH òptim de 5.5 a 7.5, tot i així existeixen moltes excepcions.

▪ **Aeració**

La majoria dels fongs són aerobis estrictes; requereixen oxigen, si més no, en petites quantitats pel seu creixement. Tot i que existeixen fongs anaerobis, els fongs que ataquen a les pells i que aquí ens ocupen pertanyen al primer grup.

- **Aigua**

Referit a humitat relativa (HR) en equilibri, el 70% d'HR és el límit inferior pel creixement de fongs, encara que alguns creixen amb molta lentitud a 65% HR en el substrat.

- **Llum**

La part visible de l'espectre (longituds d'ona entre 380 i 720nm) té poc efecte en el creixement vegetatiu dels fongs, encara que pot tenir efectes importants en l'esperulació, fent que inhibeixi el creixement extensiu de la colònia.

3.3. Fongs colonitzadors de substrats especials

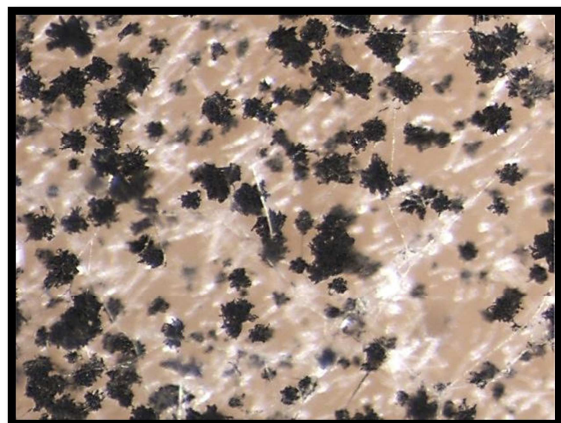
El cuir, junt amb el cartró, les plomes de les aus, les parets humides, cables d'electricitat, excrements d'animals, vernissos i pintures i altres materials es consideren substrats especials viables pel creixement de fongs, on aquests són capaços de trobar-hi aliment.

Una gran varietat d'articles amb destinacions especials han de passar proves, tipificades per reglamentacions internacionals, que acreditin la resistència a l'atac dels fongs. Les reglamentacions es refereixen tant a les soques de les espècies que han de ser assajades com a la manera de procedir i a la duració de les proves. (Muntañola 2002)

3.3.1. El creixement de fongs al cuir

Per les condicions que es donen en aquest tipus de substrat i en el seu entorn, les espècies de fongs més habituals que ataquen a la pell són: (Gattner et al., 1988; Rother, 1995; Birbir et al. 1996)

- *Aerobasidium pullulans*
- *Aspergillus brasiliensis*
- *Chaetomium globosum*
- *Cladosporium sp.*
- *Fusarium sp*
- *Mucor sp.*
- *Paecilomyces sp.*
- *Penicillium sp.*
- *Rhizopus stolonifer*
- *Trichoderma harzianum*



Imatge 2.2. Detall a 200x de les hifes i la producció d'espores de l'*Aspergillus brasiliensis*

CAPÍTOL 3

MATERIAL I MÈTODES

1. Introducció

Per a la realització d'aquesta tesi s'han fet servir diferents tècniques d'anàlisi i diferents mètodes de control microbiològic. En aquest capítol es pretén donar una visió de les diferents tècniques, mètodes i instrumentació utilitzades.

2. Material

2.1. Selecció de compostos fungicides

Amb la finalitat de limitar el nombre de compostos a assajar, d'acord amb el que s'ha explicat en el Capítol 2, a l'apartat 2.2., s'han seleccionat un total de sis compostos fungicides, cadascun d'ells de naturalesa química diferent, i que compleixen els següents criteris:

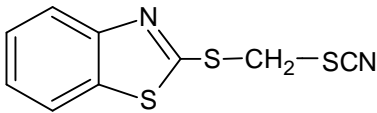
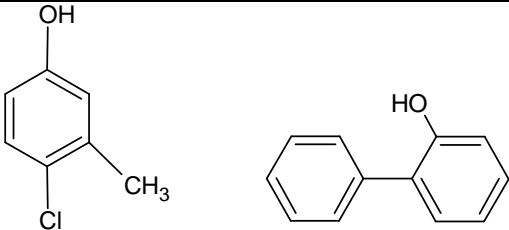
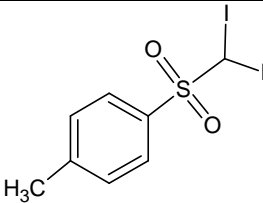
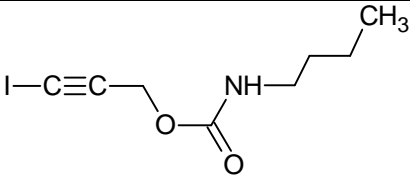
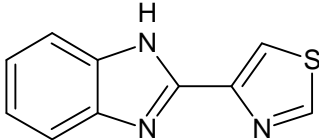
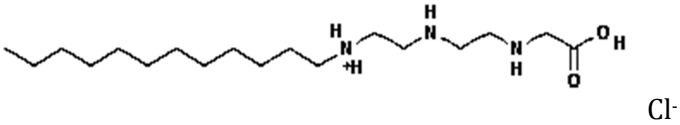
- Capacitat fungicida contrastada en altres sectors industrials. Per les seves propietats, es podria pensar que poden aportar una bona protecció en les adoberies.
- Facilitat de subministrament per part dels proveïdors.
- Compostos de diferents famílies químiques.
- Compatibilitat amb el substrat (pells vacunes i ovines) i amb les condicions d'aplicació (temperatura i pH).
- Econòmicament acceptables.
- De fàcil aplicació.

La selecció dels compostos fungicides alternatius s'ha realitzat en base a compostos que en altres sectors han resultat efectius i que posseeixen unes propietats que els poden fer aptes per utilitzar en la protecció de les pells a les adoberies.

Tots els compostos fungicides seleccionats han d'estar notificats i registrats en la Directiva 98/8/CE (Seguer i Beltrán 2003). Segons Seguer, per a la correcta selecció d'un biocida s'han de tenir en compte cinc paràmetres:

- 1) El punt d'aplicació en el procés d'adobament.
- 2) L'efectivitat enfront els microorganismes.
- 3) La compatibilitat. Condicions en les que el biocida és estable; temperatura, pH, potencial redox,...
- 4) La seguretat, valoració del risc del producte.
- 5) El preu, cost per litre.

La Taula 3.1 mostra el nom i l'estructura química molecular del principi actiu dels compostos seleccionats per aquest estudi.

FUNGICIDA	ESTRUCTURA QUÍMICA
2-(tiocianometilito)-1,3-benzotiazol, TCMTB CAS nº 21564-17-0	
Compostos fenòlics, PCMC + OPP (p-cloro-m-cresol, CAS nº 59-50-7 + o-fenilfenol, CAS nº 90-43-7)	
Diiodometil-p-tolilsulfona DIMPTS CAS nº 20018-09-1	
3-iodo-2-propinil-N-butylcarbamat IPBC CAS nº 55406-53-6	
Tiabendazol TBZ CAS nº 148-79-8	
Sal sòdica de dodecil-di(aminoetil)-glicina TEGO CAS nº 6843-97-6	

Taula 3.1. Estructura molecular dels fungicides utilitzats

L'acció fungicida dels quatre compostos alternatius seleccionats s'ha comparat amb l'eficàcia contrastada del TCMTB que s'ha agafat com a principal referència, ja que des de fa algunes dècades és el producte antifúngic de major ús en les adoberies, tot i les limitacions tècniques i de toxicitat que posseeix. Així mateix, l'estudi s'ha comparat amb una barreja de compostos fenòlics (PCMC i OPP) que també s'usa actualment en la indústria adobera, encara que molt menys que el TCMTB.

Dins la Directiva 98/8/CE, els diferents productes seleccionats es classifiquen en grups que es caracteritzen pel mode d'actuar, tal i com mostra la Taula 3.2. (Seguer i Beltrán 2003)

GRUP	FUNGICIDA
Òrgan-sofrats	TCMTB i TBZ
MODE D'ACCIÓ: Inactivar la transferència d'electrons en els citocroms, aturant el sistema respiratori.	
Carbamats	IPBC
MODE D'ACCIÓ: Penetrar en la paret de la cèl·lula, introduint-se en el citoplasma i destruint les proteïnes essencials.	
Derivats del fenol	PCMC i OPP
MODE D'ACCIÓ: Els fenols actuen específicament sobre la membrana cel·lular i inactiven els enzims intracitoplasmàtics formant complexos inestables. Les molècules lipofíliques queden atrapades pels fosfolípids de la membrana.	
Compostos halogenats	DIMPTS
MODE D'ACCIÓ: Inactiven la transferència d'electrons en els citocroms, aturant el sistema respiratori.	

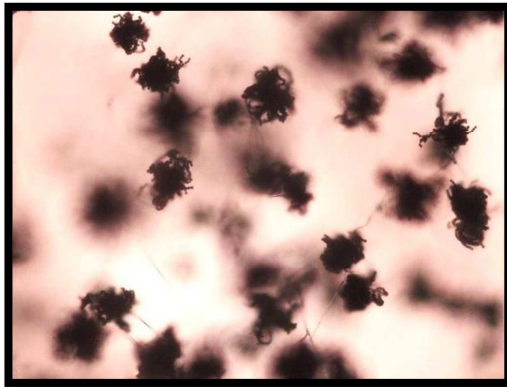
Taula 3.2. Grup al que pertanyen els fungicides seleccionats dins la Directiva 98/8/CE i mode d'acció

2.2. Selecció de fongs

La capacitat antifúngica dels fungicides seleccionats s'ha avaluat davant diferents espècies de fongs (Taula 3.3, Imatge 3.1), descrits a la bibliografia (Gattner et al., 1988; Rother, 1995; Birbir et al. 1996) com alguns dels principals responsables del danys ocasionats durant el procés de producció de pell:

MICROORGANISME	nº COL·LECCIÓ
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	CECT 2088
<i>Trichoderma harzianum</i>	CECT 2423
<i>Alternaria alternata</i>	CECT 2662
<i>Penicillium funiculosum</i>	CECT 2914

Taula 3.3. Nom i número de la "Colección Española de Cultivos Tipo" dels fongs utilitzats



Imatge 3.1. Aspecte de l'*Aspergillus brasiliensis* (esquerra) i el *Trichoderma harzianum* (dreta) utilitzats en l'estudi. Fotografia a través del microscopi òptic digital (200x)

Tots els fongs han estat subministrats per la *Colección Española de Cultivos Tipo* (CECT) de la Universitat de València. Atès que totes les soques s'han rebut liofilitzades, excepte l'*Alternaria alternata*, que ha arribat en suspensió, s'han reconstituït amb un medi de cultiu adient pel seu creixement i la posterior producció d'espores.

2.3. Material bàsic de laboratori

Per dur a terme la realització de les diferents proves, s'ha utilitzat material bàsic de laboratori. A continuació s'inclou una llista del diferent material fungible emprat.

- Material de vidre (matrassos, vasos, embuts, tubs d'assaig, ampolles Brand amb tap de rosca,...)
- Pipetes d'èmbol de diferents volums
- Plaques de Petri estèrils (de plàstic, d'un sol ús)
- Diferents eines de treball, com tisores i pinces
- Balança analítica i granetari

A part, la instrumentació més específica utilitzada, es detalla a l'apartat 3.

Els estudis sobre la pell, així com l'addició de fungicida a les mostres i la seva determinació posterior s'han realitzat en el laboratori d'investigació de l'Escola d'Enginyeria d'Igualada (EEI). Totes les proves relacionades amb l'experimentació amb fongs s'han dut a terme a les instal·lacions de la Unitat de Microbiologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona.

3. Instrumentació

3.1. Campana de flux laminar (GLATT Labortecnic, model H)

La cabina, càmera o campana de flux laminar és un recinte que utilitza un ventilador per forçar el pas d'aire a través d'un filtre d'alta eficàcia i proporcionar aire net a la zona de treball lliure de partícules de fins a 0.1 micres. Aquest tipus d'equips es fabriquen d'acer inoxidable i de forma generalment prismàtica, amb una única cara lliure (la frontal) que dóna accés a l'interior, on es localitza la superfície de treball, que normalment roman neta i estèril. (Labortecnic)

3.2. Autoclau (SELECTA Autester E)

Contenedor hermètic que permet treballar a alta pressió per realitzar una reacció industrial, una cocció o, com en aquest cas, una esterilització amb vapor d'aigua. La seva construcció ha de ser tal que resisteixi la pressió i la temperatura assolida a l'interior. La pressió elevada permet que l'aigua arribi a temperatures superiors als 100°C. L'acció conjunta de la temperatura i el vapor produeix la coagulació de les proteïnes dels microorganismes, entre elles les essencials per la vida i la reproducció dels mateixos, cosa que provoca la seva destrucció.

3.3. Cromatògraf líquid d'alta resolució - HPLC (WATERS)

La cromatografia líquida d'alta resolució és un tipus de cromatografia en columna utilitzada freqüentment en bioquímica i química analítica. L'HPLC és una tècnica utilitzada per separar els components d'una barreja basant-se en diferents tipus d'interaccions químiques entre les substàncies analitzades i la columna cromatogràfica.

En la cromatografia líquida isocràtica el compost passa per la columna cromatogràfica a través de la fase estacionària mitjançant el bombeig de líquid (fase mòbil) a alta pressió a través de la columna. La mostra a analitzar és introduïda en petites quantitats i els seus components avancen més o menys depenent de les interaccions químiques o físiques amb la fase estacionària a mida

que procedeixen per la columna. El grau de retenció dels components de la mostra depèn de la naturalesa del compost, de la composició de la fase estacionària i de la fase mòbil. El temps que triga un compost a ser eluït per la columna es denomina temps de retenció, i és una propietat identificativa característica d'un compost en una determinada fase mòbil i estacionària. Els dissolvents més utilitzats són l'aigua, el metanol i l'acetonitril (Figures 3.1 i 3.2). (Skoog 2010) (Waters)

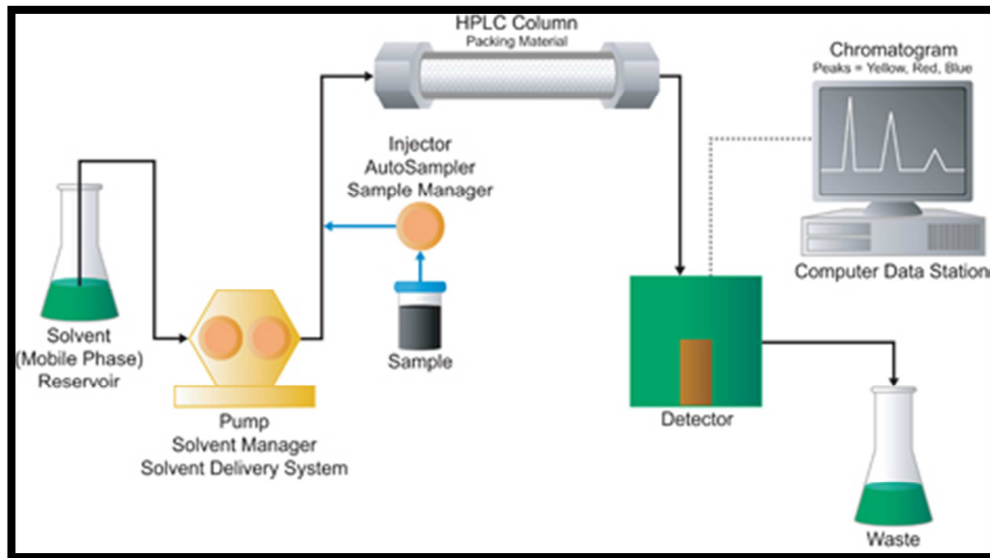


Figura 3.1. Sistema de funcionament del HPLC

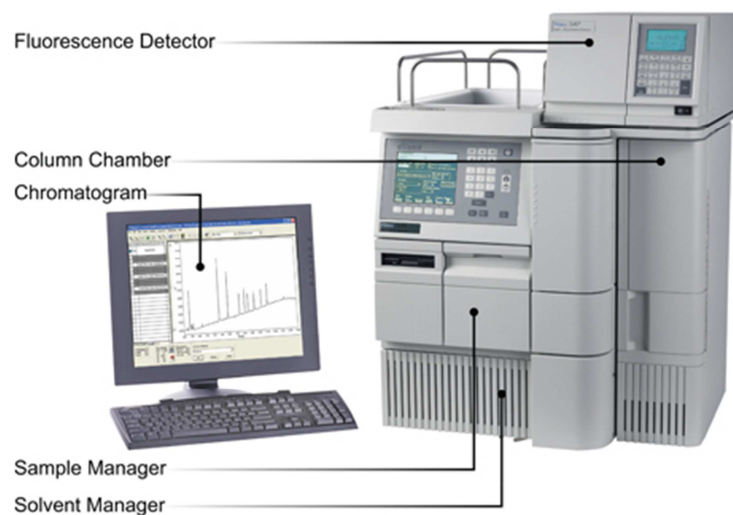


Figura 3.2. Esquema dels components de treball del HPLC

El model utilitzat ha estat un Alliance 2695, amb detector UV 2996, de WATERS.

3.4. Bombos a escala de laboratori (INOXVIC – Simplex 4)

Els bombos de laboratori són petits bombos d'acer inoxidable a escala, amb una capacitat aproximada de 4 litres. El seu funcionament és molt similar, però en petita escala, als bombos que es poden trobar en les adoberies i s'utilitzen en el laboratori per simular les condicions reals de fàbrica i així poder reproduir els processos en una petita planta pilot.

El model utilitzat en les proves està compost d'un moble d'acer inoxidable de doble paret amb el seu interior aïllat, entre paret i paret, amb escuma de poliuretà per tal de mantenir la temperatura. Disposa de dues portes de vidre temperat totalment transparent a la part frontal. A la part superior, embuts per introduir els líquids a l'interior dels bombos sense haver d'interrompre el cicle dels mateixos, els quals són totalment independents. En la part superior es troba també el quadre de comandaments per a la posada en marxa dels bombos i resistències, amb termòstat variable per escollir la temperatura desitjada. (Inoxvic)

Els bombos d'acer inoxidable són completament llisos, sense cap més obstacle que els barrots necessaris, i la seva part davantera transparent a fi de poder visionar el cicle d'elaboració del bany. (Imatge 3.2)

CARACTERÍSTIQUES TÈCNIQUES:

- Corrent trifàsica de 220 o 380 volts
- Potència motor reductor 0,125 HP
- 4 resistències de 650W
- Velocitat de 34 voltes per minut
- Regulador de resistències
- Mesures dels bombos, 300mm de diàmetre per 150mm d'ample



Imatge 3.2. Bombos d'acer inoxidable Inoxvic utilitzats per realitzar les diferents proves

3.5. Microscopi i lupa

3.5.1. Microscopi òptic (OLYMPUS, model CH)

El microscopi òptic funciona mitjançant la combinació de la llum amb lents d'augment. Els més utilitzats són els microscopis compostos que poden arribar a augmentar fins a 2000x. Estan formats per dos sistemes de lents, l'ocular i l'objectiu (que consisteix en una composició de diferents lents), cadascun en un extrem del tub tancat on estan situats.

La resta de l'estructura del microscopi òptic inclou un suport sota el qual es troba un mirall que reflexa la llum. Aquesta llum passa per un forat d'un altre suport on es col·loca el material a examinar. El conjunt es completa amb un mecanisme amb el que s'enfoca més lluny o més a prop la mostra a observar.

3.5.2. Microscopi òptic digital (LEICA)

Microscopi òptic, amb un funcionament similar al que s'explica en l'apartat 3.5.1., però amb la principal diferència d'una càmera digital integrada a l'aparell.

Amb un rendiment d'alta qualitat òptica, el model utilitzat, Leica DM1000, amb càmera DFC 290, és ideal per aplicacions de citologia, hematologia i patologia.

Es pot configurar per adaptar-se a les necessitats de l'usuari, com l'altura dels oculars, tubs amb angle variable d'inclinació, mòduls ergonòmics i una unitat coaxial amb longitud ajustable. (Leica-microsystems)



Imatge 3.3. Microscopi LEICA DM1000

3.5.3. Microscopi estereoscòpic (LEICA)

El microscopi estereoscòpic o lupa binocular es diferencia dels anteriors per oferir una imatge estereoscòpica (en 3D) de la mostra. Per això és necessari que els ulls observin la imatge amb angles lleugerament diferents.

Existeixen dos tipus de disseny, el convergent (o Greenough) o d'objectiu comú (o Galileo). Aquest últim és el que s'ha utilitzat en la tesi. El disseny d'objectiu comú utilitza dues rutes òptiques paral·leles (una per a cada ull) que es fan convergents en el mateix punt i amb un cert angle. (Leica-microsystems)

El model utilitzat és un estereomicroscopi LEICA MZ12.5, amb sistema òptic parfocal (conserva el punt d'enfoc encara que es canviï la longitud focal) de ruta òptica paral·lela, càmera LEICA DFC 490 i software LEICA LAS. (Imatge 3.4)



Imatge 3.4. Microscopi estereoscòpic LEICA MZ12.5 utilitzat

3.6. Espectrofotòmetre (DATACOLOR 400™)

Espectrofotòmetre d'alt rendiment per mesures per reflectància. Disposa de múltiples obertures de mesura i la disponibilitat d'accessoris per incrementar la utilitat.

(Datacolor)



Imatge 3.5. Espectrofotòmetre DATACOLOR 400 utilitzat

3.7. Màquina de dividir (FORTUNA, model 620)

L'acció de la màquina de dividir es basa en seccionar la pell, recolzada entre dos cilindres, mitjançant una ganiveta en forma de cinta sense-fi, que es mou en un pla paral·lel al costat flor i al costat de la carn. (Morera, 2002)

3.8. Equip d'assaig amb control UV (Atlas SUNTEST XLS+)

El SUNTEST XLS+ és un equip d'assaig de sobretaula amb control UV d'última generació per realitzar proves fiables d'avaluació I+D. El model estàndard té una àrea d'exposició de 1100 cm², això el fa adequat per mostres planes o 3D.

Disposa de làmpades de xenó de 1700 W refrigerades per aire, pantalla tàctil per controlar i visualitzar els paràmetres d'assaig, ajust i control directes d'irradiància amb rang de longitud

d'ona de 300-800 nm/lux; o 300-400 nm/340 nm, ajust i control directes de temperatura de càmera, memòria per a 10 mètodes d'assaig definits per l'usuari, àrea d'exposició horitzontal, estàtica, per mostres planes o 3D i control de temperatura en el rang de 45-100 °C, entre d'altres opcions (Imatge 3.6). (Atlas)



Imatge 3.6. Aparell de radiació UV utilitzat, SUNTEST XLS+

3.9. Càmera climatitzada (ANGLO)

Les condicions de temperatura i humitat de l'ambient real es poden simular en el laboratori a través d'una càmera climatitzada. Es tracta d'un equip que recrea ambients en condicions controlades de temperatura (entre -60 i 180°C), humitat (entre 0 i 99%) i llum. Es pot programar per realitzar cicles de mesura i avaluació de l'envelliment de mostres orgàniques, polimèriques i/o de teixits. (UPC)

3.10. Molí triturador (Thomas Scientific, WILEY MILL model nº 3)

Per triturar la pell i obtenir pols de pell necessària per realitzar diferents proves de determinació de fungicida en pell s'ha utilitzat un molí triturador, concretament el Model nº 3 de la marca Wiley Mill. Construït a mà totalment d'acer, amb quatre ganivetes de tall rotatives. El filtre usat és de 2mm de diàmetre. (Thomassci)

3.11. Aparell d'ultrasons (SELECTA)

Per realitzar les extraccions de fungicida de la pell, s'ha requerit d'un bany d'ultrasons amb calefacció. S'ha utilitzat un recipient de doble cos, construït totalment d'acer inoxidable i amb dispositiu de buidat. El model utilitzat és el HD 3000866, de la marca SELECTA, amb capacitat de 6 L, i 180 W de potència del generador. (Grupo Selecta)

3.12. Espectrofotòmetre UV (PERKIN ELMER, Lambda 25)

El principi de l'espectroscopia UV-VIS implica l'absorció de radiació ultravioleta - visible per una molècula, causant la promoció d'un electró d'un estat basal a un estat excitat, alliberant-se l'excés d'energia en forma de calor.

L'espectrofotòmetre utilitzat en aquest treball (Lambda 25) comprèn un rang de radiació d'entre 190-1100nm, amb un ample de banda d'1nm. Les làmpades que incorpora són de deuteri i tungstè-halogen prealineat. (Perkin Elmer)

4. Mètodes

4.1. Recompte d'espores en suspensió

Per treballar amb els fongs, es necessita preparar suspensió d'espores. Per obtenir aquesta suspensió, els fongs es sembren en plaques de Petri amb el medi de cultiu adequat (Agar Dextrosa de Patata o Agar Saboraud (Oxoid, Basingstocke, UK)). Un cop creixen i produeixen espores ja es pot preparar suspensió de les espores i titular-la.

La preparació de suspensió d'espores es fa amb solució Ringer (Scharlab o Oxoid, Basingstocke, UK), solució salina que conté: clorur de sodi, clorur de potassi i clorur de calci dihidratat. Es treballa dins una campana amb un bunsen encès, per mantenir l'esterilitat de l'espai. S'hi afegeixen unes gotes de solució Ringer amb 0.1% de tensioactiu no iònic (éster de sacarosa o "Tween" (PANREAC)) a la placa on hi creix el fong del que es s'han d'obtenir les espores. Amb l'ajut d'una nansa de Drigalski (Imatge 3.7) estèril es raspen les espores per que es despreguin a la solució. Amb una pipeta d'èmbol s'aspira la suspensió Ringer de la placa, que conté ja les espores alliberades. La suspensió es reserva en tubs estèrils tapats.



Imatge 3.7. Nansa de Drigalski

A partir d'aquí, es pot titular la suspensió obtinguda de dues maneres diferents:

- Recompte directe amb microscopi. Mètode del *Hematímetre de Thoma*.
- Per dilucions i creixement en placa. Aquest mètode és més fiable, ja que es compten només les espores viables. Però és important fer primer el recompte amb microscopi per tenir una orientació de l'ordre de dilució.

S'ha de tenir en conte, que cada vegada que es prepara suspensió d'espores nova, s'ha de titular, ja que per desenvolupar els diferents assajos es necessitarà treballar amb una suspensió de l'ordre de 10^5 espores/mL.

4.1.1. Recompte directe amb microscopi

Per fer el recompte amb aquest mètode s'utilitza un microscopi òptic a 400x augments (*veure apartat 3.5.1.*). Una gota de la suspensió d'espores a comptar es col·loca sobre un portaobjectes, anomenat *Hematímetre de Thoma*, i a sobre d'ella un cobreobjectes.

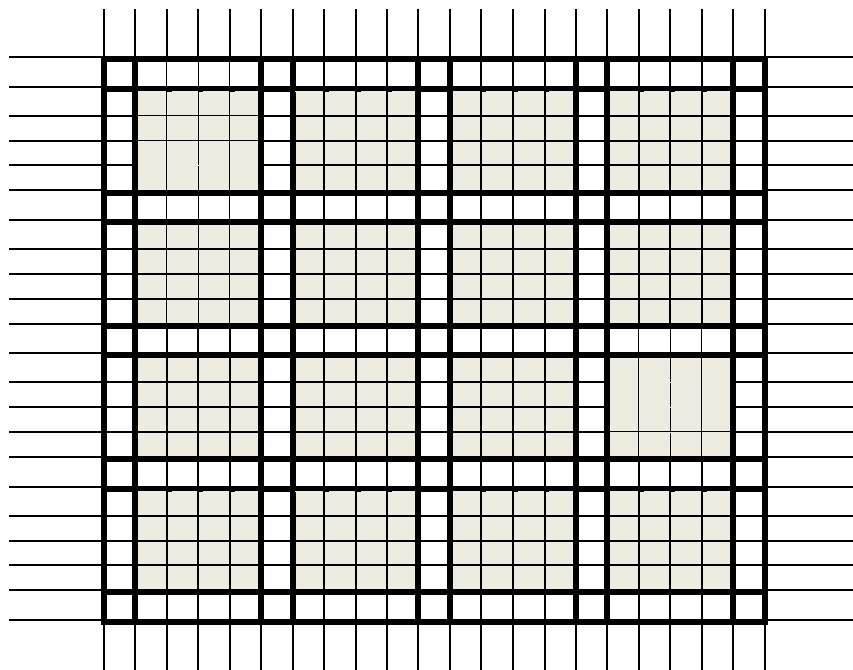


Figura 3.3. Esquema de la quadrícula que es dibuixa en l'Hematímetre de Thoma.

Aquest portaobjectes hi té dibuixades unes quadrícules, tal i com es mostra a la Figura 3.3. S'hi representen 16 quadrats grans que contenen 16 quadrats petits cadascun. S'han de comptar les espores que s'observen dins dels quadrats més petits. Està dispostat d'aquesta manera per facilitar el recompte d'espores i poder fer la mitjana de les espores observades en els espais més petits. Aquest és el valor que es necessita per l'Equació 3.1, que extrapola els valors a la suspensió.

$$(n^{\circ} \text{ espores} / \text{mL}) = \frac{n^{\circ} \text{ espores}}{n^{\circ} \text{ quadrats petits}} \cdot \frac{400 \text{ quadrats petits}}{0.1 \text{ mm}^3} \cdot \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3 (\text{o } 1 \text{ mL})}$$

Equació 3.1.

Aquest mètode té l'avantatge de que és senzill i ràpid. Però l'inconvenient que presenta és que les espores que s'observen i es compten poden estar vives o mortes, i només interessen les espores viables. Per tant, els valors obtinguts amb aquest mètode són orientatius, i més alts que el recompte amb placa.

A partir d'aquí, per tenir un recompte més fiable, es compten les espores per dilucions.

4.1.2. Per dilucions i creixement en placa

Per fer el recompte en placa s'han de preparar dilucions de la suspensió. El recompte d'espores es fa a partir del valor obtingut amb el recompte directe amb microscopi (*veure apartat 4.1.2.*).

Es treballa amb tot el material estèril. Es preparen tantes dilucions com l'exponent (10^x) obtingut al comptar les espores amb microscopi. Aquestes dilucions es preparen en tubs Eppendorfs. A cadascun dels tubs s'hi afegeixen 0.9mL de solució Ringer amb Tween (esterilitzada). I, tot seguit es prepara un banc de dilucions seriades 1/10.

Per fer el recompte, se sembra 0.1mL de cadascuna de les tres últimes dilucions en una placa amb medi de cultiu agar Saboraud + cloranfenicol (SIGMA). Amb l'ajut d'una nansa de Drigalski es dispersa per la placa fins que el medi absorbeixi tot el líquid. Aquesta operació es fa per duplicat.

Es tapen les plaques i es reserven a la càmera climatitzada a 30°C durant 48 - 72h. Quan comencen a créixer els fongs es compten les colònies visualment. D'aquesta manera, el recompte només serà de les espores viables de la suspensió. El valor obtingut en cada placa es multiplica pel factor de dilució corresponent.

4.1.3. Exemple d'un recompte de suspensió d'espores de *Aspergillus brasiliensis*

A continuació s'inclouen les dades d'un dels recomptes que s'ha fet al preparar suspensió d'espores de *Aspergillus brasiliensis*.

Recompte amb microscopi → 4.64×10^7 esp./mL

Preparació de les dilucions →

	Epp 1	Epp 2	Epp 3	Epp 4	Epp 5	Epp 6
Ordre de la dilució al tub	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Ordre de la dilució a la placa	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}

Recompte de les espores que hi creixen a les plaques:

Nombre de colònies que creixen a la placa

Tub 10^{-6} - Placa $10^{-7} \rightarrow 0$	0
Tub 10^{-5} - Placa $10^{-6} \rightarrow 4$	(duplicat)
Tub 10^{-5} - Placa $10^{-6} \rightarrow 3$	$(4 + 3) / 2 = 3.5 \rightarrow 3.5 / (10^{-6}) = 3.5 \times 10^6$ espores/mL
Tub 10^{-4} - Placa $10^{-5} \rightarrow 26$	(duplicat)
Tub 10^{-4} - Placa $10^{-5} \rightarrow 46$	$(26 + 46) / 2 = 36 \rightarrow 36 / (10^{-5}) = 36 \times 10^5$ espores/mL

Mitjana $\rightarrow 3.5 \times 10^6$ espores / mL

Per tant;

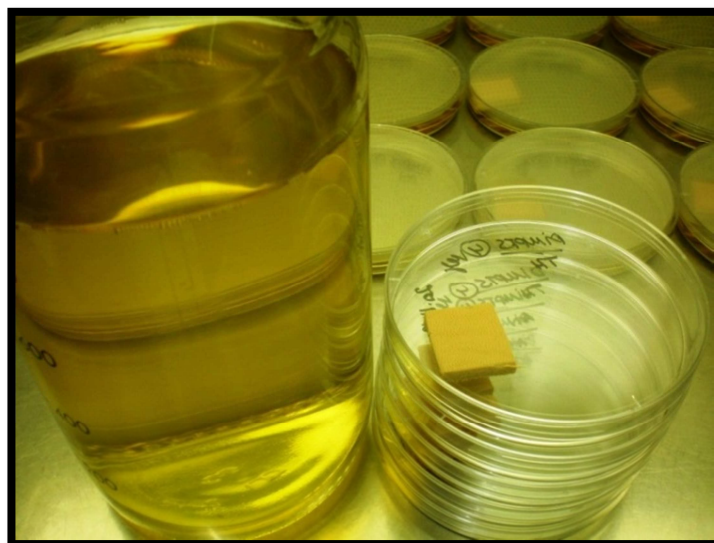
Recompte amb microscopi $\rightarrow 4.6 \times 10^7$ esp./mL

Preparació de les dilucions $\rightarrow 3.5 \times 10^6$ espores / mL

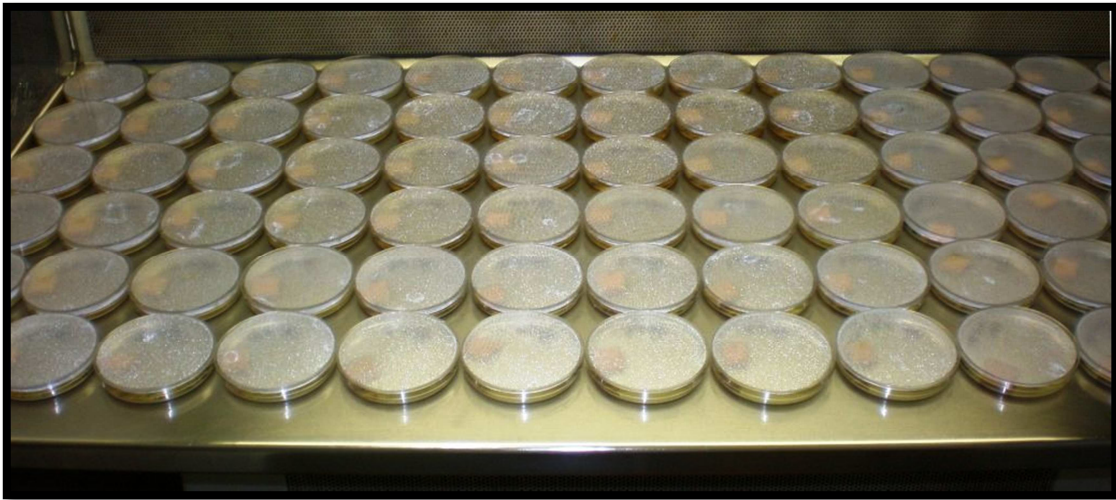
4.2. Mètode de control de creixement microbiològic

La resistència al creixement de fongs de les mostres tractades durant tot l'estudi s'ha assajat d'acord amb la norma ASTM D4576-01 enfront les soques seleccionades en cada cas.

Es realitza utilitzant mostres de pell humida de 25mm x 25mm aproximadament. Aquestes mostres es col·loquen en plaques de Petri estèrils i es rodegen de medi de cultiu Agar Dextrosa de Patata (Oxoid, Basingstocke, UK) fos, acabat d'esterilitzar (Imatge 3.8). L'agar es deixa solidificar amb les plaques tapades per mantenir la humitat. (Imatge 3.9)



Imatge 3.8. Preparació de les plaques amb les mostres de pell



Imatge 3.9. Plaques amb la pell i el medi de cultiu solidificant

Quan l'agar ja ha solidificat, a cada placa s'hi afegeixen dues gotes de suspensió d'espores (de l'ordre de 10^5 espores/mL) de cada fong escollit; una directament sobre la mostra i l'altra sobre el medi de cultiu, tal i com mostra la Figura 3.4.

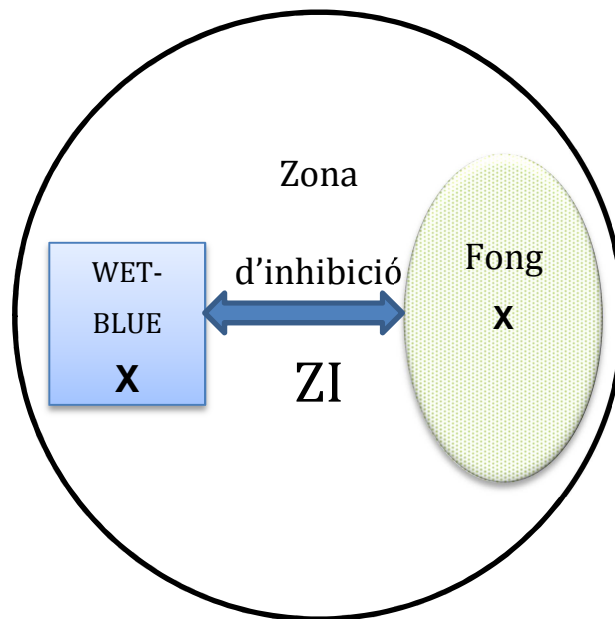


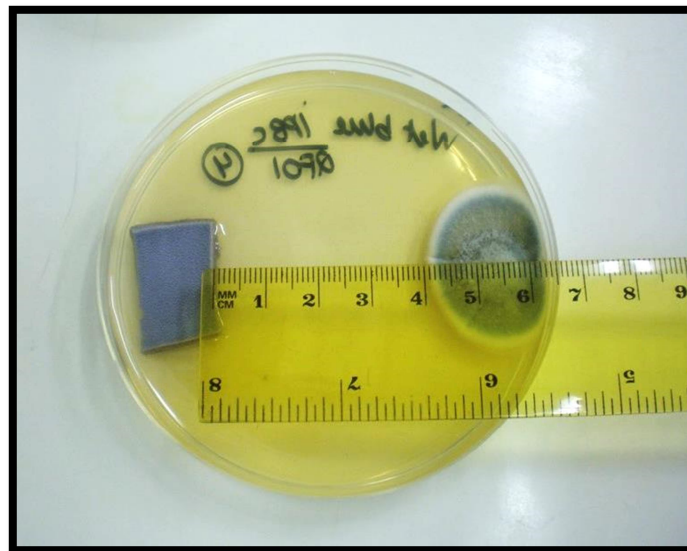
Figura 3.4. Esquema amb les localitzacions de la sembra (X).
Zona d'inhibició (ZI) projectada pel fungicida que impregna la mostra de pell

Cada prova es realitza per triplicat. Les plaques s'emmagatzemen a la càmera climatitzada (veure apartat 3.9) a 26°C, en atmosfera humida, i es realitza el control de creixement de fongs setmanalment comparant amb una mostra control (el mateix tipus de pell però sense fungicida). S'anota el percentatge (des de 0% fins a 100%) de superfície de pell recoberta per fong. Aquest

control es realitza durant un període de 90 dies en el cas de les mostres en estat wet blue i amb píquel de conservació, i durant 2 o 4 setmanes per les pells amb adobament vegetal.

D'acord amb la norma ASTM 4572-01, en l'informe de resultats de creixement de fongs ha de constar el percentatge de superfície de pell recoberta per fong. A partir d'aquí, s'observa que en les mostres que presenten un 0% de creixement de fong a la seva superfície, tot i no presentar cap mena de creixement sobre la pell, sí que hi poden aparèixer soques de fongs creixent al seu voltant. Per tant, per ser més precisos en els resultats i poder diferenciar les pells que presenten un 0% de creixement entre elles, s'ha introduït en l'informe un altre paràmetre anomenat "Zona d'Inhibició (ZI)" (Figura VI). Aquesta zona es pot definir com l'àrea d'agar de la placa on el creixement de fong queda retingut per l'efecte difusor que crea el fungicida aplicat a la mostra de pell.

S'estableix una zona d'inhibició de 45mm com la màxima que es pot anotar. Això significa que no s'observa creixement de fong a la placa. Tot i que en la placa de la Imatge 3.10 es produeix creixement, si aquest creixement a la placa fos 0, la zona d'inhibició estaria al voltant de 45mm, ja que és a la distància de 45mm aproximadament on creixeria la soca.



Imatge 3.10. Mesura de la distància entre la mostra de pell i el fong que creix a la placa. Zona d'inhibició (ZI)

4.3. Determinació de fungicida en pell

Les mostres de pell destinades a la determinació de fungicida s'han de deixar assecar a temperatura ambient, en una sala condicionada. Un cop seques, es trituren utilitzant un molí

(veure apartat 3.10) per obtenir pols de pell. D'aquesta pols de pell es determinarà el fungicida per cromatografia líquida d'alta resolució, HPLC (veure apartat 3.3.).

Aquests anàlisis s'han realitzat seguint la norma EN ISO 13365 per a la determinació de fungicides en pell, i adaptant-la als fungicides aquí assajats. Actualment es tracta del procediment IUC 29 implementat a la EEI en un treball de Màster d'Enginyeria del Cuir (Reyes 2011).

Consta d'una primera part d'extracció del fungicida de la pell. Es pesen $1 \pm 0.001\text{g}$ de mostra (pols de pell) en un recipient Brand, s'hi afegeixen 20mL del dissolvent adequat per l'extracció i es manté durant una hora als ultrasons (veure apartat 3.11.). El dissolvent utilitzat és acetonitril en pràcticament tots els casos, excepte pel TBZ que s'utilitza metanol. Posteriorment, en el dissolvent filtrat s'hi determina el contingut de fungicida amb el cromatògraf HPLC (veure apartat 3.3.). (Font et al. 2011) Les dades cromatogràfiques es mostren a la Taula 3.4.

Dades cromatogràfiques					
Software	Empower 2 Software Build 2154 SPs				
Model columna	Teknokroma Mediterranea Sea 18				
Temperatura columna	30°C				
Velocitat de flux	1.23 mL/min				
	Eluient A – Metanol				
	Eluient B – Aigua ultrapura				
Fase mòbil	Eluient C – Aigua ultrapura + 0.1% HCOOH				
	Eluient D – Acetonitril + 0.1% HCOOH				
Gradient de flux	A	B	C	D	
<i>de 0 a 7 min</i>	0	0	40%	60%	
<i>de 7 a 11min</i>	0	0	40%	60%	
<i>a partir de 11min...</i>	0	0	5%	95%	

Taula 3.4. Dades cromatogràfiques del mètode utilitzat per la determinació de fungicides en pell

Abans de començar, amb les determinacions s'han realitzat les rectes de calibratge dels fungicides seleccionats. Les dades s'inclouen en l'Annex A.

És essencial disposar de l'espectre UV (*veure apartat 3.12.*) de cadascuna de les molècules. Aquesta dada ajuda a identificar i confirmar els pics obtinguts en els cromatogrames obtinguts amb l'HPLC de les mostres analitzades. Els espectres UV s'inclouen en l'Annex B.

4.4. Determinació de la toxicitat de les aigües residuals

La determinació de la toxicitat dels banys residuals s'ha dut a terme en un laboratori extern. Per tant, aquí només s'indica la base del mètode utilitzat.

Es reserven els banys de diferents processos escollits per determinar la toxicitat de les aigües residuals. Es determina la toxicitat segons la norma de qualitat de l'aigua UNE EN ISO 11348-3:2009, utilitzant el mètode Microtox. D'aquesta manera es pot comparar l'impacte mediambiental que suposen els fungicides alternatius respecte el TCMTB i la barreja de fenòlics.

El sistema Microtox® és un bioassaig que examina la toxicitat aguda de mostres d'aigües residuals i compostos purs basant-se en la reducció de la bioluminescència natural de la bactèria marina *Vibrio fischeri* en presència d'agents contaminants. La toxicitat s'expressa com la concentració d'agent que produeix la reducció del 50% de la luminescència inicial (EC50) i les unitats són equitox/m³. (UNE EN ISO 11348-3:2009)

CAPÍTOL 4

AÏLLAMENT DE FONGS REALS DE FÀBRICA

1. Introducció

Per treballar en condicions semblants a la contaminació real de fàbrica, es decideix utilitzar fongs que es trobin habitualment a les adoberies. Per aquesta raó, a partir de mostres de pell contaminades, extretes de fàbriques adoberes, s'ha volgut aïllar i identificar les espècies de fongs que hi creixen.

2. Objectius

L'objectiu principal és aïllar i identificar diferents espècies de fongs detectades en fàbriques de pell. A partir de mostres contaminades per diferents microorganismes es pretén aïllar els fongs presents i un cop ben diferenciats, identificar-los per poder-los utilitzar en proves posteriors.

3. Material i reactius

Es va partir de tres mostres de les següents característiques:

- **Mostra 1 (QF01).** Pell vegetal humida, contaminada amb una o més espècies, extreta de l'adoberia "Curtits Font Vallès S.L"
- **Mostra 2 (QF02).** Fongs extrets d'una pell vegetal humida, conservats en un recipient amb humitat, aïllats a la fàbrica "Curtits Font Vallès S.L"
- **Mostra 3 (LL01).** Pell wet blue (encara que en aquest cas, seca) contaminada per una o més espècies, recollida de l'adoberia "Curtits Aqualata S.A"

Per despendre els fongs de l'hàbitat on hi creixien, el material i reactius específics que es van necessitar són:

- Erlenmeyers estèrils (tapats amb gassa, cotó i paper d'embalar)
- Solució Ringer per eucariotes (Scharlaud o Oxoid, Basingstocke, UK)
- Plaques de Petri estèrils, de plàstic d'un sol ús

- Medi de cultiu Agar Dextrosa de Patata (Oxoid, Basingstocke, UK)

Tot el material que es va utilitzar es va esterilitzar prèviament a l'autoclau. (*veure Capítol 3, apartat 3.2.*)

4. Part experimental

Per poder identificar els fongs obtinguts de mostres reals, era important aïllar-los i assegurar que no hi haguessin diferents espècies en una mateixa placa. Per fer-ho, a partir de les mostres problema descrites en l'apartat 3, es va procedir de la següent manera:

- 1) Es van afegir 50mL de solució Ringer estèril dins de cada erlenmeyer.
- 2) De cadascuna de les tres mostres es va introduir un tros en tres erlenmeyers diferents, i es van tancar. Aquesta operació es va realitzar amb l'ajut de material estèril, així com pinces i tisores.
- 3) Es van deixar els erlenmeyers en agitació constant durant un mínim de 24h, dins la càmera climatitzada (*veure Capítol 3, apartat 3.9.*) a 30°C.
- 4) Passat aquest temps, i segons l'aspecte de la solució obtinguda, es van sembrar en placa amb medi de cultiu agar de patata. Cada mostra es va sembrar de la següent manera:

- **Mostra 1 (QF01)**

Es van sembrar quatre gotes de la suspensió d'espores obtinguda en una placa amb medi de cultiu agar de patata. De la suspensió restant, es van preparar dilucions seriades 1/10 amb solució Ringer, fins a diluir tres o quatre vegades. De cadascuna de les dues últimes dissolucions es van dipositar 0.1mL en una placa amb medi de cultiu agar de patata i es van distribuir uniformement per tota la placa. Totes les plaques es van reservar a la càmera climatitzada (*veure Capítol 3, apartat 3.9.*) a 30°C.

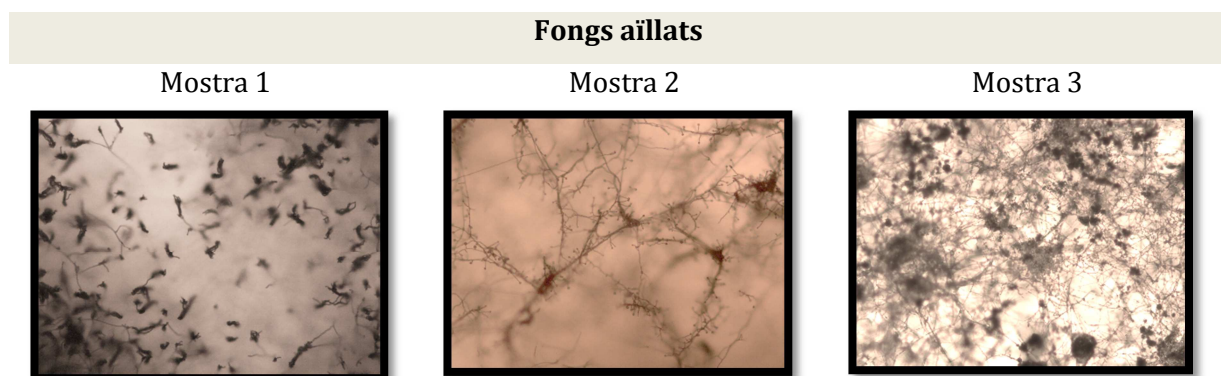
- **Mostra 2 (QF02)**

Es va procedir exactament de la mateixa manera que per la Mostra 1.

▪ **Mostra 3 (LL01)**

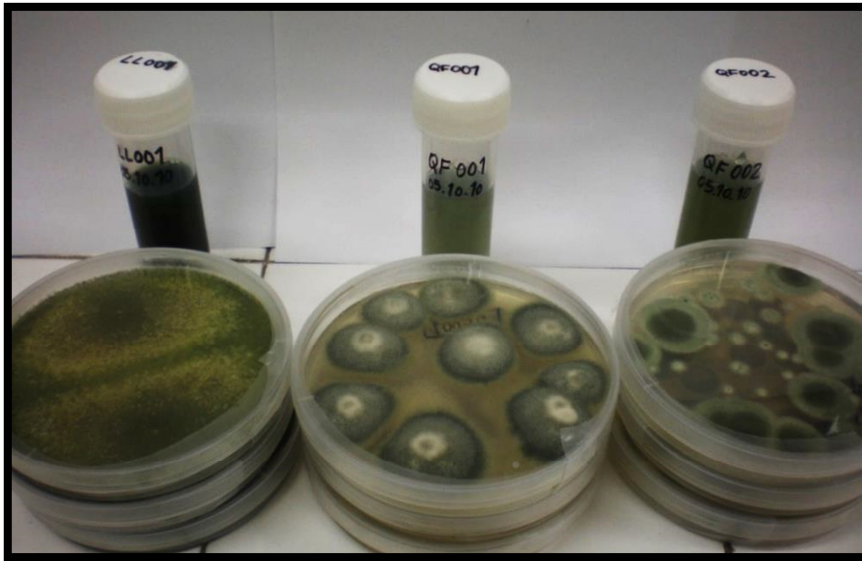
Després de mantenir l'agitació durant 24h, semblava que no s'haguessin després espores de la pell, ja que la solució era pràcticament transparent. Per tant, es va retallar una part de la mostra i es va sembrar directament en una placa amb medi de cultiu agar de patata. Simultàniament, també es van sembrar quatre gotes de la suspensió obtinguda en una altra placa amb medi de cultiu agar de patata, per observar un possible creixement de fongs.

- 5) Passats tres dies, es va observar el creixement. Es va confirmar la presència de diferents espècies, però no es distingia quants tipus diferents de fongs hi creixien. Era important distingir-los i separar-los per enviar-los al laboratori de la *Colección Española de Cultivos Tipo* (CECT) per a la seva identificació.
- 6) Es van fotografiar les plaques amb microscopi òptic digital (*veure Capítol 3, apartat 3.5.2.*) i amb microscopi estereoscòpic (*veure Capítol 3, apartat 3.5.3.*). A la Imatge 4.1 es pot veure una fotografia de cada una de les mostres capturades amb la càmera del microscopi òptic digital, a 200 augments.



Imatge 4.1. Diferents soques de fongs aïllats capturades amb el microscopi òptic digital, a 200x

Amb l'ajut d'observacions microscòpiques es va poder observar més d'una espècie de fong en algunes de les plaques, per això es va seguir fent dilucions. Es van sembrar plaques noves de dues maneres diferents: traslladant espores directament de les plaques amb creixement de soques i a través de suspensió d'espores preparada de les diferents plaques, diluint i ressebrant. Aquesta operació es va repetir fins a observar un sol tipus d'espores en cadascuna de les plaques (Imatge 4.2).



Imatge 4.2. Mostra dels tres tipus de fongs completament aïllats. Placa i suspensió d'espores de cadascun d'ells

Un cop els fongs van ser completament aïllats, es van sembrar en plaques, es van identificar i junt amb un full de registre, els cultius es van enviar a la CECT, tal i com es mostra a la Imatge 4.3.



Imatge 4.3. Enviament a la CECT.

5. Resultats

Els resultats rebuts de la CECT s'adjunten a l'Annex C. En ells s'indiquen les proves realitzades, les característiques i els resultats que van portar a identificar els fongs trobats. El nom de les espècies de les soques aïllades es mostren a la Taula 4.1.

NOM REFERÈNCIA	IDENTIFICACIÓ TAXONÒMICA
QF01	<i>Penicillium spinulosum</i>
QF02	<i>Penicillium decumbens</i>
LL01	<i>Trichoderma harzianum</i>

Taula 4.1. Nom de les espècies de fongs aïllades i identificades.

Aquestes soques formen part, junt amb les espècies adquirides, dels fongs utilitzats per realitzar les proves posteriors de control de creixement sobre pell.

CAPÍTOL 5

CONCENTRACIÓ MÍNIMA D'INHIBICIÓ

1. Introducció

La Concentració Mínima d'Inhibició (CMI), en microbiologia, és la concentració més baixa d'un antimicrobià (en aquest cas, un fungicida) que inhibeix el creixement visible d'un microorganisme després de la seva incubació. Les concentracions inhibidores mínimes són importants en els diagnòstics de laboratori per confirmar la resistència de microorganismes a l'agent antimicrobià i, a més, per monitoritzar l'activitat de nous agents antimicrobians.

Una definició més concreta es refereix a la CMI com la concentració mínima d'un antimicrobià, expressada en $\mu\text{g/mL}$, que inhibirà el creixement d'un microorganisme in vitro. Els agents antimicrobians diluïts conjuntament amb una quantitat estandarditzada de l'organisme pur aïllat, s'incuben de 18 - 24 hores i es deixen en observació fins que es desenvolupi el creixement dels microorganismes. La quantitat mínima d'antimicrobià o fungicida necessària per inhibir el creixement és la que proporciona la CMI. (Andrews 2001)

Les CMI's es poden determinar mitjançant mètodes de dilució en caldo de cultiu, normalment seguint la directriu d'una institució de referència tal com el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), BSAC (*British Society for Antimicrobial Chemotherapy*) o EUCAST (*European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*). (ESCMID 2000)

2. Objectius

L'objectiu principal és determinar la Concentració Mínima d'Inhibició (CMI) dels diferents fungicides escollits per dur a terme la recerca (Taula 5.1). La CMI es determina per tal de conèixer la susceptibilitat dels fongs sobre els fungicides.

Cada producte antifúngic presenta una CMI diferent per cada soca de fong tractada. Es determinarà la CMI de cada fungicida per cadascun dels fongs seleccionats.

3. Material i reactius

S'ha determinat la CMI de tots els fungicides escollits per a aquesta tesi (veure Capítol 3, Taula 3.1). El nom, el contingut de principi actiu, el nom comercial i el distribuïdor de cadascun d'ells es mostren a la Taula 5.1.

Fungicida	Tipus	Nom comercial	Distribuïdor
TCMTB	Comercial 30%	Mirecide TC/61.AR	LAMIRSA
	Patró 99.5%	CL01250250	SCHARLAU
PCMC	Comercial 40%	Preventol CMK 40	LANXESS
	Patró ~100%	FE0290250	SCHARLAU
OPP	Comercial 45%	Preventol OF 45	LANXESS
	Comercial 42%	Preventol WB-L	LANXESS
PCMC + OPP	Patró 90-95%	Amical 48	DOW
	Comercial 40%	Amical Flowable	DOW
DIMPTS	Patró 99%	Preventol MP100	LANXESS
	Comercial 30%	Preventol MP260	LANXESS
IPBC	Comercial 40%	BIOBAN IPBC 40LE	DOW
	Patró 99%	Metasol TK100	LANXESS
TBZ	Comercial 60%	Textar 60T	TECNIDEX
	Comercial 10%	Tego 51	Johnson Diversey

Taula 5.1. Fungicides als que se'ls ha determinat la CMI

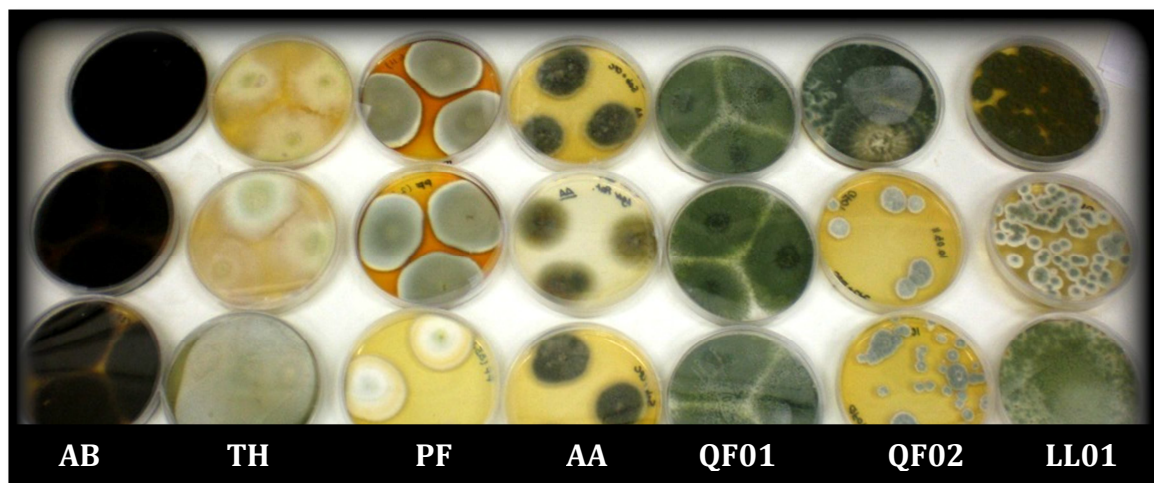
A part dels fungicides anomenats, s'ha determinat la CMI de la dimetilformamida (DMF), dissolvent utilitzat per preparar les dissolucions dels productes no solubles en aigua. És important determinar si les solucions que contenen DMF exerceixen efecte antifúngic que pugui interferir en els resultats.

La preparació de les dissolucions s'ha fet en el laboratori d'Investigació de l'Escola d'Enginyeria d'Igualada, i l'experimentació amb fongs s'ha realitzat a les instal·lacions de la Unitat de Microbiologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona.

Els fongs enfront als quals s'ha determinat la Concentració Mínima d'Inhibició són els que apareixen a la Taula 5.2. La Imatge 5.1 mostra l'aspecte d'aquests fongs sobre medi de cultiu agar Saboraud i agar de patata.

	MICROORGANISME	nº COL·LECCIÓ	REF.
Fongs adquirits de la CECT	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	CECT 2088	AB
	<i>Trichoderma harzianum</i>	CECT 2423	TH
	<i>Penicillium funiculosum</i>	CECT 2914	PF
	<i>Alternaria alternata</i>	CECT 2662	AA
Fongs aïllats d'adoberies	<i>Penicillium spinulosum</i> (QF01)	Fongs aïllats (veure Capítol 4)	QF01
	<i>Penicillium decumbens</i> (QF02)		QF02
	<i>Trichoderma harzianum</i> (LL01)		LL01

Taula 5.2. Relació de fongs utilitzats per determinar la CMI dels productes



Imatge 5.1. Aspecte de les set soques de fongs utilitzades. Cada columna correspon a un fong diferent

El material bàsic de laboratori utilitzat ha estat:

- Tubs d'assaig de (20x200) mm amb taps metàl·lics
- Xeringa de plàstic
- Proveta de 1000mL
- Plaques Petri estèrils de plàstic, d'un sol ús, de Ø 9 cm
- Pipetes d'embol de 1mL i 200µL, amb les seves puntes estèrils
- Tubs Eppendorfs estèrils
- Tubs estèrils de plàstic amb tap de 5mL de volum
- Replicador
- Pinces

Els reactius amb els que s'ha treballat són:

- Medi de cultiu Destrosa Agar Saboraud (Oxoid, Basingstocke, UK)
- Cloranfenicol (SIGMA)
- Solució Ringer per eucariotes (Scharlab o Oxoid, Basingstocke, UK)
- N,N-Dimetilformamida PRS (PANREAC)

4. Part experimental

4.1. Preparació de diferents dilucions de fungicida

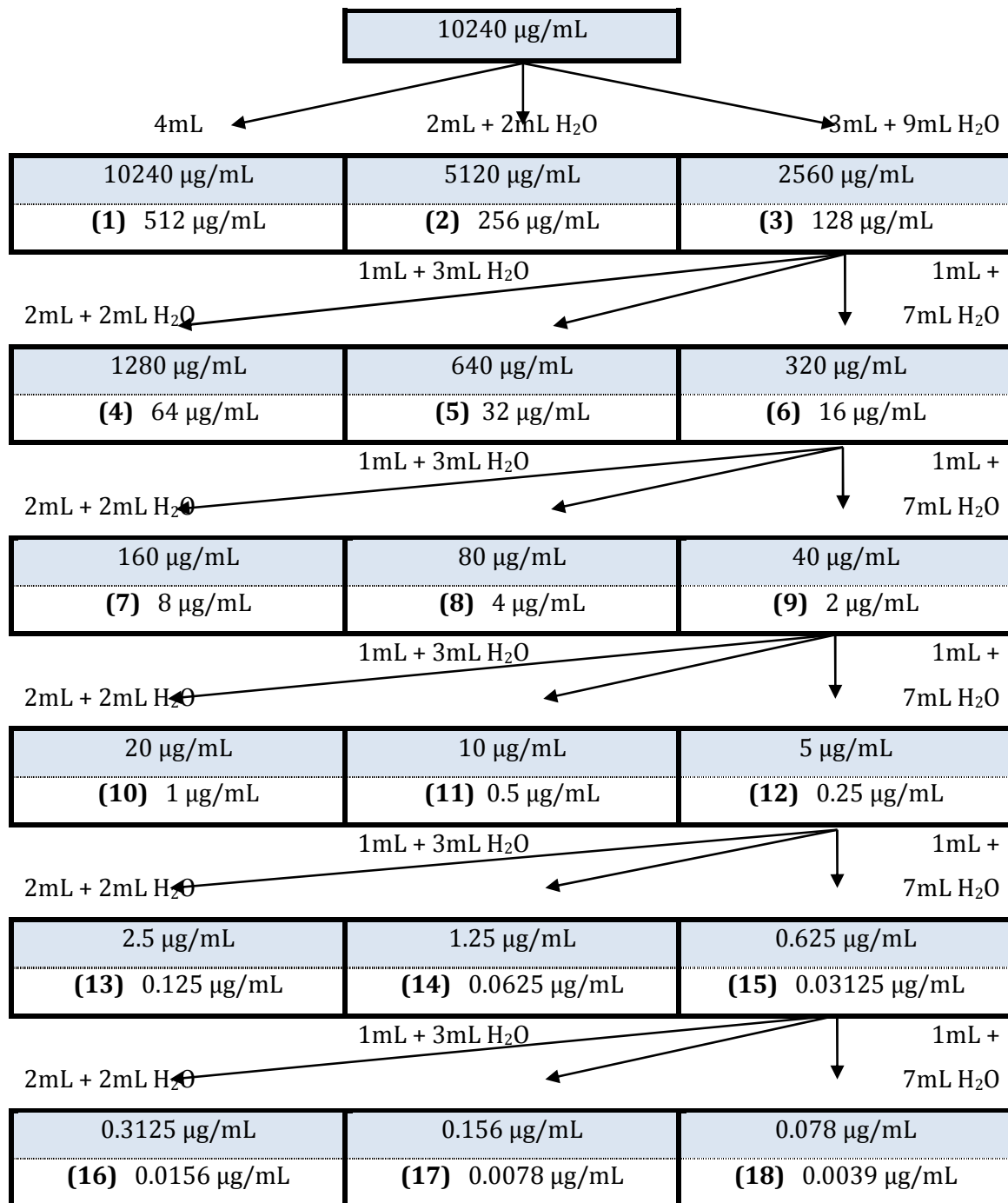
Les dilucions de cada fungicida a assajar es preparen seguint la Taula 5.3 (ESCMID 2000).

Concentració antimicrobià ($\mu\text{g/mL}$) en la solució stock	Volum solució stock (mL)	Volum d'aigua destil·lada (mL)	Concentració d'antimicrobià obtinguda ($\mu\text{g/mL}$)	Concentració final en medi després d'afegir 19mL d'agar ($\mu\text{g/mL}$)
10240	1	0	10240	512
10240	1	1	5120	256
10240	1	3	2560	128
2560	1	1	1280	64
2560	1	3	640	32
2560	1	7	320	16
320	1	1	160	8
320	1	3	80	4
320	1	7	40	2
40	1	1	20	1
40	1	3	10	0.5
40	1	7	5	0.25
5	1	1	2.5	0.125
5	1	3	1.25	0.06
5	1	7	0.625	0.03
0.625	1	1	0.3125	0.015
0.625	1	3	0.1562	0.008
0.625	1	7	0.0781	0.004

Taula 5.3. Preparació de les dilucions per determinar la CMI d'un agent antimicrobià

La Taula 5.3 es pot representar d'una manera més gràfica per facilitar la preparació de les dilucions, amb un rang de concentracions que va de 512 $\mu\text{g/mL}$ fins a 0.0039 $\mu\text{g/mL}$. La primera dilució de totes es prepara amb el dissolvent adequat pel producte antifúngic (aigua

desionitzada, i en cas de no ser soluble en aigua, amb dimetilformamida), i la resta de dilucions amb aigua desionitzada (Taula 5.4). També s'ha determinat la CMI de la DMF per comprovar que aquest no exerceixi un fals efecte antifúngic als resultats.



Taula 5.4. Esquema per a la preparació de les dilucions d'antifúngic.

Els valors dels requadres ombrejats corresponen a les concentracions preparades en cada vial. Els valors dels requadres blancs i anomenats, són les concentracions definitives que queden a la placa, un cop es dilueix 1mL de cada dissolució amb 19mL de medi de cultiu.

4.2. Preparació i sembra de les plaques

Es preparen tubs amb 19mL de medi de cultiu agar Saboraud. Aquest medi es prepara seguint les indicacions del producte, afegint posteriorment un 0.5g de cloranfenicol per 1L de medi de cultiu, per evitar contaminació bacteriana. Els tubs amb el medi de cultiu s'esterilitzen a l'autoclau (veure Capítol 3, apartat 3.2.), durant 20min, a 120°C de temperatura i 1atm de pressió.

Per emplacar, es treballa a la campana, mantenint l'esterilitat de l'entorn. S'afegeix 1mL de cada dilució de fungicida en un tub, s'homogeneïtza i es buida a l'interior d'una placa, lentament, procurant que no quedin bombolles. El medi solidifica al refredar-se la placa. Es repeteix cada operació per triplicat. També es preparen plaques sense fungicida per fer el control, només amb el medi de cultiu del tub. Se'n fan tres per cada fong.

La sembra de fongs a les plaques es fa utilitzant el replicador (Imatge 5.2).



Imatge 5.2. Replicador per la sembra de fongs en placa

En cadascun dels forats del replicador s'hi pot introduir suspensió d'espores titulada (10^5 esp./mL) (veure Capítol 3, apartat 4.1.). S'omplen els forats escollits amb les suspensions d'espores dels fongs corresponents, i amb l'ajut del replicador, es marca cada placa. Es tapen i es deixen a la càmera climatitzada (veure Capítol 3, apartat 3.9.) a 26 - 30°C, entre 3 i 5 dies, depenent de la velocitat de creixement de cada fong.

4.3. Lectura de resultats

La lectura de resultats d'aquest tipus de proves es realitza observant el creixement de fongs a les plaques, comparant amb el blanc i omplint un registre com l'exemple de la Taula 5.5:

Nom fungicida	Concentració de fungicida											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fong 1												
Fong 2												
Fong 3												
Fong 4												

Taula 5.5. Plantilla pel registre dels resultats de la CMI

La Taula 5.5 s'omple utilitzant els següents criteris:

(+)	<i>S'observa creixement en els tres replicats</i>
(+/-)	<i>S'observa creixement en algun dels tres replicats</i>
(-)	<i>No s'observa creixement en cap dels tres replicats</i>

La concentració amb un valor (-) just abans d'un (+) o d'un (+/-), es considerarà la CMI, ja que és la mínima concentració de fungicida que evita el creixement de fongs en el medi.

5. Resultats

La Taula 5.6 mostra els resultats de la CMI de cada fungicida enfront de les soques adquirides de la CECT.

CMI ($\mu\text{g/mL}$) – Fongs adquirits de la CECT					
Fungicida	Tipus	<i>Aspergillus brasiliensis</i> CECT 2088	<i>Trichoderma harzianum</i> CECT 2423	<i>Penicillium funiculosum</i> CECT 2914	<i>Alternaria alternata</i> CECT 2662
TCMTB	Comercial 30%	7.6	7.6	15.3	0.95
PCMC	Patró 99.5%	65	65	32.5	32.5
	Comercial 40%	123	123	61.6	61.6
OPP	Patró <i>pur</i>	64	32	32	32
	Comercial 45%	2.77	11.1	1.38	0.69
PCMC+OPP	Comercial 42%	61.9	124	30.9	61.9
DIMPTS	Patró 90-95%	62.1	62.1	62.1	124
	Comercial 40%	3.8	7.6	1.9	1.07
IPBC	Patró 99%	0.30	1.21	0.61	0.30
	Comercial 30%	0.79	3.9	1.94	0.79
TBZ	Patró 99%	15.6	1.95	0.487	125
	Comercial 60%	3.85	1.9	0.95	1.9
TEGO	Comercial 10%	1194	597	149	1194

Taula 5.6. Resultats de la CMI ($\mu\text{g/mL}$) enfront els fongs adquirits de la CECT

Com més baix és el valor de la CMI, major capacitat fungicida posseeix el producte, ja que es necessita menor quantitat d'antifúngic per inhibir el creixement de les soques. És important destacar que cada fungicida presenta una CMI diferent depenent del fong al que s'enfronta.

Exceptuant el TEGO, que presenta un CMI molt elevada en comparació amb la resta de productes seleccionats, la concentració mínima d'inhibició de la resta (tant de la formulació comercial com del producte pur) presenta valors acceptables per a realitzar els estudis posteriors en la pell. Sabent que el TCMTB i la barreja de compostos fenòlics, així com el PCMC i el OPP per separat, són fungicides utilitzats en el sector, la CMI dels productes proposats com alternatius (DIMPTS, IPBC i TBZ) indica una molt bona capacitat antifúngica davant els fongs comprats. S'haurà de comprovar si aquests productes resulten eficaços actuant sobre una matriu com la pell.

Determinar la concentració mínima dels patrons és important per determinar si aquestes molècules posseeixen una bona capacitat antifúngica. En alguns casos, com el DIMPTS, la formulació comercial resulta més efectiva enfront les soques escollides. Això pot ser degut a que diferents additius utilitzats en la formulació tenen cert efecte sinèrgic o poden potenciar el de la molècula DIMPTS. Adminis et al. (2001) afirmen que en un producte no només és important el

principi actiu; els components utilitzats per formular les emulsions poden ser elements crítics per un rendiment efectiu.

La Taula 5.7 inclou els resultats de la CMI davant les soques aïllades de fàbrica. En aquest cas, només s'ha determinat pels cinc fungicides comercials que s'utilitzaran al llarg de tota la tesi: les fórmules comercials del TCMTB, mescla de compostos fenòlics, DIMPTS, IPBC i TBZ. El TEGO s'ha descartat després de veure el resultat de la CMI enfront els fungicides adquirits de la CECT.

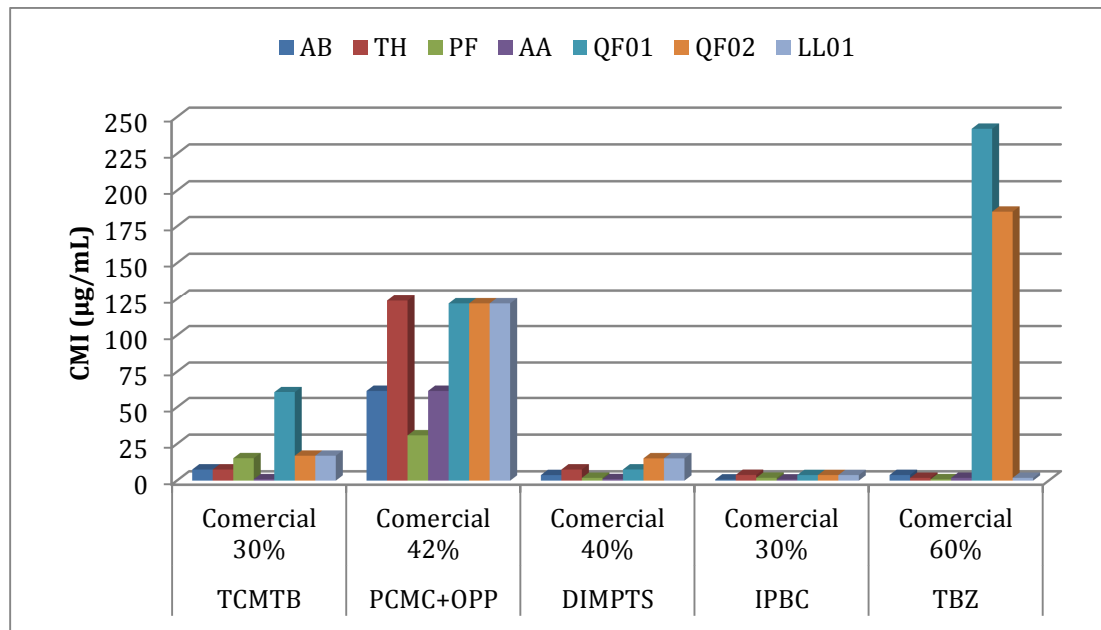
CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$) - Fongs aïllats				
Fungicida	Tipus	<i>Penicillium spinulosum</i> QF01	<i>Penicillium decumbens</i> QF02	<i>Trichoderma harzianum</i> LL01
TCMTB	Comercial 30%	61	17	17
PCMC+OPP	Comercial 42%	122	122	122
DIMPTS	Comercial 40%	7.62	15.2	15.2
IPBC	Comercial 30%	3.81	3.81	3.81
TBZ	Comercial 60%	242	123- 246	1.9

Taula 5.7. Resultats de la CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$) amb els fongs aïllats de fàbrica

A partir dels resultats observats, es confirma una bona activitat antifúngica dels tres fungicides alternatius escollits (DIMPTS, IPBC i TBZ), al comparar els resultats obtinguts amb les dues formulacions utilitzades habitualment a les adoberies (TCMTB i barreja de compostos fenòlics). Excepte pel TBZ, la CMI dels fungicides alternatius és menor que la CMI dels productes convencionals amb les soques aïllades. Aquest fet pot ser degut a la resistència adquirida d'aquests fongs als productes habituals de fàbrica.

També s'ha determinat la CMI del dissolvent DMF. Els resultats mostren que el DMF exerceix efecte antifúngic sempre i quan aquest estigui en una dissolució del 50% o més concentrada. Per dissolucions menors del 50% no provoca cap tipus d'interferència. En tots els casos en els que s'ha utilitzat DMF com a dissolvent, la CMI obtinguda del fungicida ha estat una dissolució que contenia un percentatge menor al 50% de DMF, per tant, no afecta als resultat.

En la Gràfica 5.1 es poden veure representats els valors de la CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$) dels principals productes amb els que es treballarà en aquest estudi, enfront les set soques escollides.



Gràfica 5.1. Valors de la CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$) dels principals fungicides que s'utilitzaran per aquest estudi davant les set soques de fongs seleccionades.

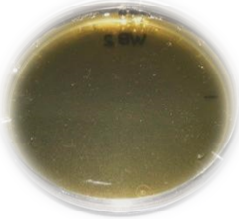
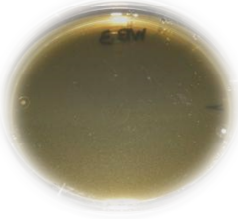
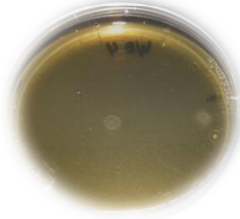
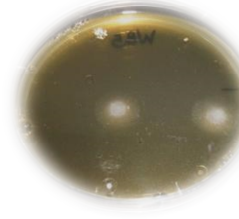
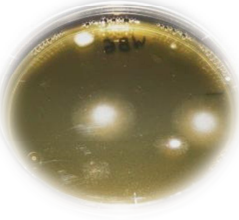
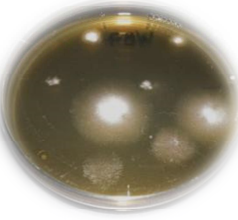
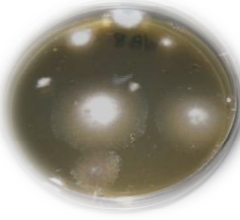
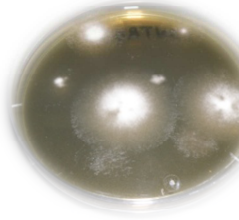
Els dos fungicides convencionals (TCMTB i mescla de fenòlics) presenten una CMI major que els tres fungicides alternatius (DIMPTS, IPBC i TBZ) enfront de pràcticament les set soques escollides. Es destaca que l'acció antifúngica del TBZ és molt diferent depenent del fong a assajar.

La Concentració Mínima d'Inhibició dels cinc fungicides utilitzant les tres soques aïllades d'adoberies és superior a la CMI amb les soques de col·lecció. Es destaca que la concentració mínima de TBZ per inhibir el creixement dels dos tipus de *Penicillium* (*P.spinulosum*, QF01, i *P.decumbens*, QF02) és molt superior a la concentració necessària per inhibir el creixement de la resta de fongs.

Segons Kennedy (2004) existeixen dos tipus de resistències; inherent i adquirida. La resistència inherent és la que el fong posseeix a un determinat tipus de substrat, una resistència que ha estat sempre present. En canvi, existeix una resistència adquirida que fa que determinades espècies puguin sobreviure tot i la presència de biocides. Això és degut a que aquests microorganismes han adquirit resistència amb el temps. Es considera que un fong pot adquirir una certa resistència a partir de 20 generacions de creixement de soques enfront dosis baixes d'un mateix antifúngic.

Utilitzar dosis adequades de fungicida, separar i evitar el contacte de les pells contaminades amb les que no ho estan i alternar fungicides diferents cada sis mesos són tres pautes importants que proposa Kennedy (2004) per evitar que els fongs aconseguixin una resistència adquirida als antifúngics.

La Imatge 5.3 és un exemple de lectura de creixement dels fongs de la CECT (AB, TH PF i AA) sobre medi de cultiu amb la barreja de compostos fenòlics (PCMC + OPP). S'observa clarament que cada fong experimenta una CMI diferent.

Fenòlics (dil.2)	Fenòlics (dil.3)	Fenòlics (dil.4)	Fenòlics (dil.5)
 <i>No s'observa creixement</i>	 <i>No s'observa creixement</i>	 <i>Es comença a visualitzar el TH (dues taques al centre de la placa)</i>	 <i>L'AB (part superior) i l'AA (inferior) són els següents fongs que hi creixen</i>
Fenòlics (dil.6)	Fenòlics (dil.7)	Fenòlics (dil.8)	Fenòlics (dil.9)
 <i>L'AB, el TH i l'AA es fan més grans</i>	 <i>Per últim, comença a créixer el PF entre l'AN i el TH</i>	 <i>Tots segueixen el seu creixement</i>	 <i>Tots segueixen el seu creixement</i>

Imatge 5.3. Exemple de lectura del creixement de fongs. Cas dels compostos fenòlics.

Aquesta observació sempre es fa comparant amb una placa control, és a dir, amb una placa amb medi de cultiu, però sense cap fungicida afegit.

6. Conclusions

Tots els fungicides estudiats, excepte la sal sòdica de dodecil-di(aminoetil)-glicina (TEGO), presenten una CMI acceptable davant les soques adquirides de la CECT. Per aquesta raó, aquest producte s'ha descartat per estudis posteriors.

Amb les soques de la *Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)*, els tres fungicides proposats com alternatius, el diiodometil-p-tolilsulfona (DIMPTS), el 3-iodo-2-propinil-N-butilcarbamat (IPBC) i el tiabendazol (TBZ) presenten una CMI més baixa que els fungicides convencionals 2-(tiocianometiltio)-1,3-benzotiazol (TCMTB) i la barreja de compostos fenòlics (p-cloro-m-cresol PCMC i o-fenilfenol OPP). Davant les soques aïllades, el DIMPTS i el IPBC presenten una CMI molt menor que la resta dels fungicides.

En el cas del DIMPTS, la CMI de la formulació comercial és menor que la CMI del patró, al contrari del que es pugui pensar, ja que el contingut de principi actiu és bastant inferior. Això pot ser degut a que els additius de la formulació poden tenir capacitat antifúngica, o que, afegits a la molècula, poden potenciar la capacitat del DIMPTS.

Els dos fungicides utilitzats convencionalment, el TCMTB i la barreja de fenòlics, presenten una CMI més elevada pels fongs aïllats. Aquestes tres soques són espècies que han sobreviscut a les fàbriques, a processos tractats amb aquests productes, per tant poden posseir una resistència adquirida a les molècules. El cas de la soca LL01 és un exemple, ja que es tracta de la mateixa espècie *Trichoderma harzianum* que es va rebre de la CECT, però el seu comportament és diferent davant el TCMTB. Serà interessant observar la seva resposta en cada cas.

CAPÍTOL 6

APLICACIÓ DE FUNGICIDES SOBRE PELL WET BLUE

1. Introducció

La tècnica d'adobament predominant en el món és l'adobament al crom (un 85% del total). El crom confereix unes propietats úniques a la pell que fan que aquesta arribi a ser un material amb moltes utilitats. (Hauber 2005) La pell just després del procés d'adobament al crom, en estat humit, s'anomena wet blue.

La pell en estat wet blue és susceptible de ser atacada per fongs degut a les seves característiques, que afavoreixen el desenvolupament d'aquests tipus de microorganismes. Per això, protegir la pell adobada al crom i humida és un dels principals objectius a assolir en aquest treball.

Les primeres proves han consistit en aplicar el fungicida directament en pell wet blue per comprovar si són eficaços o no per protegir aquest tipus de producte.

2. Objectius

L'objectiu principal és comprovar si els fungicides que s'han proposat com alternatius als que s'utilitzen normalment en adoberies conserven les seves propietats antifúngiques sobre la pell wet blue.

S'aplicaran diferents quantitats de productes antifúngics sobre pell wet blue i posteriorment es realitzarà un control de creixement de fongs sobre aquesta pell per verificar si són capaços de protegir les mostres davant l'atac de diferents soques.

3. Material i reactius

La Taula 6.1 mostra els fungicides utilitzats per comprovar la seva eficàcia sobre pell wet blue.

FUNGICIDA	NOM	% PRINCIPI ACTIU
TCMTB	2-(tiocianometiltio)-1,3-benzotiazol	30%
Fenòlics (PCMC+OPP)	p-cloro-m-cresol + o-fenilfenol	42%
DIMPTS	Diiodometil-p-tolilsulfona	40%
IPBC	3-iodo-2-propinil-N-butylcarbamat	30%
TBZ	Tiabendazol	60%

Taula 6.1. Fungicides utilitzats en l'estudi del Capítol 6

Es pretén comparar l'acció fungicida dels tres compostos alternatius seleccionats amb l'eficàcia contrastada del TCMTB que s'ha escollit com a principal referència, ja que des de fa algunes dècades és el producte antifúngic de major ús en les adoberies, tot i les limitacions tècniques i de toxicitat que posseeix. Així mateix, la barreja de compostos fenòlics (PCMC i OPP) que també s'usa actualment en la indústria adobera, encara que molt menys que el TCMTB, també servirà com a referència en aquest estudi.

Els fongs usats per fer el control de creixement s'indiquen en la Taula 6.2.

MICROORGANISME	nº COL·LECCIÓ
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	CECT 2088
<i>Trichoderma harzianum</i>	CECT 2423

Taula 6.2. Nom i número de col·lecció dels fongs utilitzats en l'estudi del Capítol 6

De cadascun dels dos fongs es prepara suspensió d'espores amb solució Ringer de l'ordre de 10^5 esp./mL per fer els assajos (veure Capítol 3, apartat 4.1.)

4. Part experimental

4.1. Preparació d'una pell lliure de bactericides i fungicides

L'estudi de creixement de fongs es duu a terme sobre pell wet blue. Per evitar possibles interferències amb els fungicides a avaluar, es realitza un adobat al crom a una pell piquelada en la que no s'hi havien afegit bactericides ni fungicides durant el remull.

Per assegurar que no quedin restes de cap producte anterior que pugui interferir en els resultats, el primer que es fa són diversos rentats de la pell piquelada amb acetona.

Posteriorment, es deixa assecar una mostra de la pell on s'hi determina el possible contingut de fungicida, segons el mètode EN ISO 13365 (veure Capítol 3, apartat 4.3.). El resultat ha demostrat l'absència d'aquestes molècules.

El procés d'adobament de la pell es realitza d'acord amb la fórmula de la Taula 6.3.

Adobament al crom	
60 % H ₂ O	
4 % clorur de sodi	
4 % sal de crom 33 % basicitat	Rodar 1/2 hores
4 % sal de crom 33 % basicitat	Rodar 3 hores
1 % formiat de sodi	Rodar 3 hores
<i>Nit en repòs</i>	
Controlar pH (2.8 – 3.0)	
2 % hidrogencarbonat de sodi	Rodar 3 hores
Controlar pH (3.5 – 4.0)	
Ts > 100 °C - Escórrer	

Taula 6.3. Adobat al crom de pells piquelades, sense fungicida. Ofertes sobre pes de pell piquelada

A partir d'aquesta pell wet blue, lliure de productes fungicides, es realitzen totes les proves posteriors.

4.2. Aplicació de fungicida sobre pell wet blue

Es retallen mostres de la pell wet blue preparada de 25mm x 25mm. Per simular les condicions reals d'aplicació en fàbrica, les mostres necessàries es dipositen en recipients tancats junt amb la quantitat de fungicida escollida en cada cas i el 100% d'aigua sobre pes de pell wet blue.

Aquests recipients es mantenen en agitació constant durant 4 hores. Passat aquest temps, a les mostres impregnades amb producte antifúngic se'ls realitza un control de creixement de fongs.

La resistència al creixement de fongs de les mostres tractades es testa d'acord amb la norma ASTM D4576-01 (veure Capítol 3, apartat 4.2.) enfront l'*Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088) i el *Trichoderma harzianum* (CECT 2423), les dues soques més invasives de les adquirides per aquest estudi. El control de creixement es realitza durant un període de 90 dies.

S'efectuen dos estudis de concentracions de fungicida diferents:

4.2.1. Oferta del 0.1% - 0.5% - 1% de fungicida

Per a cadascun dels cinc productes antifúngics seleccionats, es fa un primer estudi comparatiu de tres ofertes diferents del mateix producte. S'han escollit tres concentracions de 0.1%, 0.5%, i 1% de fungicida, calculat sobre pes de pell wet blue.

D'aquesta manera es vol comprovar si els productes seleccionats són efectius aplicats sobre pell, i en cas de ser així, una orientació de la quantitat necessària per inhibir el creixement de fongs.

La quantitat de producte s'afegeix junt amb un 100% d'aigua, per garantir i simular el bany per cada mostra.

4.2.2. Estudi comparatiu amb un 0.2% de fungicida

A partir de la bibliografia (Seguer et al. 2002), d'entrevistes amb professionals i junt amb els resultats obtinguts en les proves anteriors, s'observa que una oferta aproximada del 0.2% sobre pes de pell wet blue amb un 100% d'aigua podria proporcionar una protecció adequada davant el creixement de fongs.

Partint d'aquestes hipòtesis, es realitza un estudi comparatiu entre totes les molècules afegint un 0.2% de producte sobre pes de pell wet blue.

D'aquesta manera, l'efecte antifúngic de les molècules és comparable entre elles, ja que la quantitat afegida de producte en cada cas és la mateixa.

5. Resultats

La manera més adient d'avaluar els resultats obtinguts en aquest treball és observar cada setmana el creixement de fongs en la pell tractada i col·locada en les plaques.

D'acord amb la norma ASTM 4572-01, en l'informe de resultats de creixement de fongs ha de constar el percentatge de superfície de pell recoberta per fong, i per poder diferenciar les pells que presenten un 0% de creixement entre elles, s'anota la "Zona d'Inhibició". (veure Capítol 3, apartat 4.2.)

5.1. Oferta del 0.1% - 0.5% - 1% de fungicida

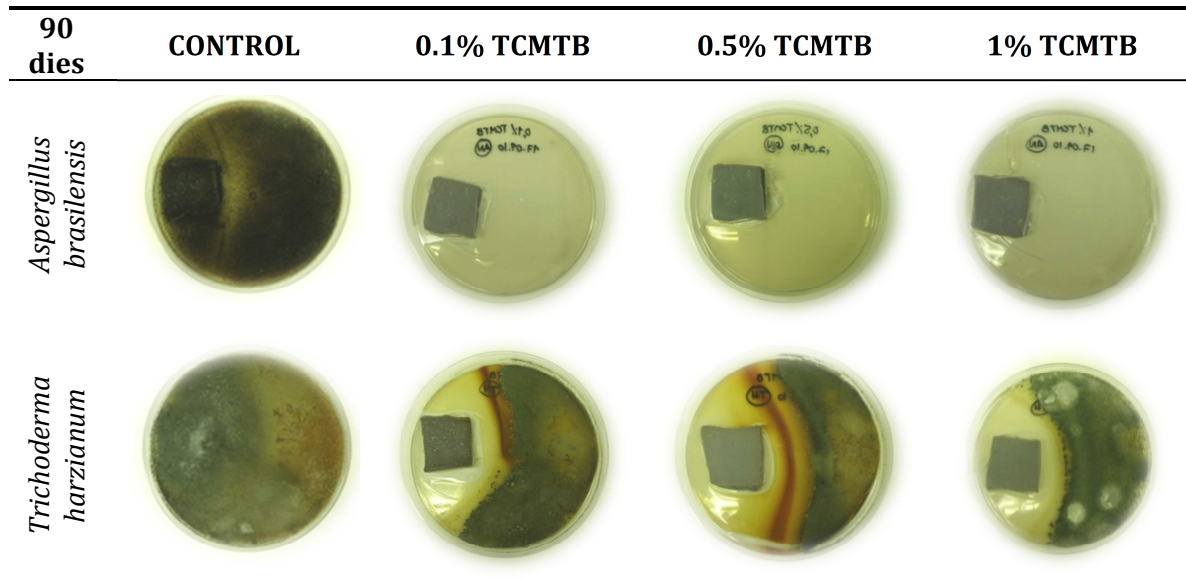
Una zona d'inhibició de 45mm és la màxima que es pot anotar i significa que no s'observa creixement de fong a la placa. A la Taula 6.4, tal i com era d'esperar, totes les mostres control (sense fungicida) presenten un 100% de creixement de fong sobre la superfície de la pell després d'una o dues setmanes d'incubació i, per tant, la zona d'inhibició ràpidament és de 0mm. Els valors que s'inclouen a la taula són la mitjana de les tres plaques per cada prova, ja que el control de creixement es fa per triplicat.

% FUNGICIDA	<i>Aspergillus brasiliensis</i> CECT 2088		<i>Trichoderma harzianum</i> CECT 2423	
	CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)
CONTROL	100	0	100	0
TCMTB	0.1 %	0	45	4
	0.5 %	0	45	0
	1 %	0	45	5
Fenòlics	0.1 %	77	0	98
	0.5 %	0	18	0
	1 %	0	35	19
DIMPTS	0.1 %	0	15	0.5
	0.5 %	0	16	0
	1 %	0	35	8
IPBC	0.1 %	0	26	0
	0.5 %	0	36	0
	1 %	0	45	0
TBZ	0.1 %	53	0	100
	0.5 %	0	22	100
	1 %	0	38	0

Taula 6.4. Resultats del percentatge del Creixement en Superfície (CS) per fongs i de la Zona d'Inhibició (ZI) observada en mostres amb diferents ofertes de fungicida, després de 90 dies d'incubació.

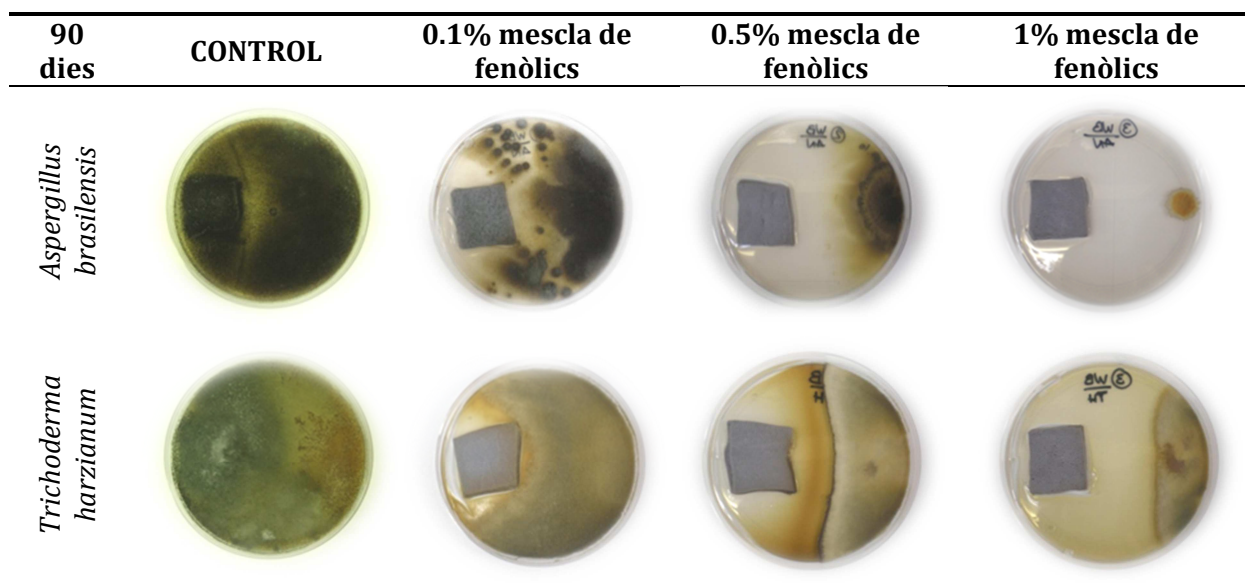
Pel TCMTB, en el cas de *Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088), no s'observa creixement de fongs en cap de les tres ofertes considerades (0.1, 0.5 i 1.0%). La zona d'inhibició és la màxima (45mm) fins i tot per l'oferta més baixa. Pel contrari, s'observa el creixement del *Trichoderma harzianum* (CECT 2423) en totes les plaques per cadascuna de les tres ofertes considerades, tot i que només la oferta del 0.1% és ineficaç per a que el fong ataquí la pell.

Es pot resumir doncs que un 0.1% de TCMTB sobre pes de pell wet blue és suficient contra *Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088) però insuficient contra el *Trichoderma harzianum*. (CECT 2423) (Imatge 6.1)



Imatge 6.1. Resultats de la capacitat fungicida de diferents ofertes de TCMTB després de 90 dies d'incubació.

Respecte la barreja de compostos fenòlics, una oferta del 0.1% no és suficient per cap dels dos fongs estudiats. Després de 90 dies de prova, el percentatge de pell coberta per l'*Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088) i el *Trichoderma harzianum* (CECT 2423) resulta entre el 70% i el 100%. Una oferta del 0.5% sobre pes de pell wet blue de la barreja de compostos fenòlics sí que és adequada per protegir les mostres de pell enfront els dos tipus de fong, mentre que un 1% ofereix una protecció més que adient per evitar el creixement. Aquest raonament s'observa a la Imatge 6.2.



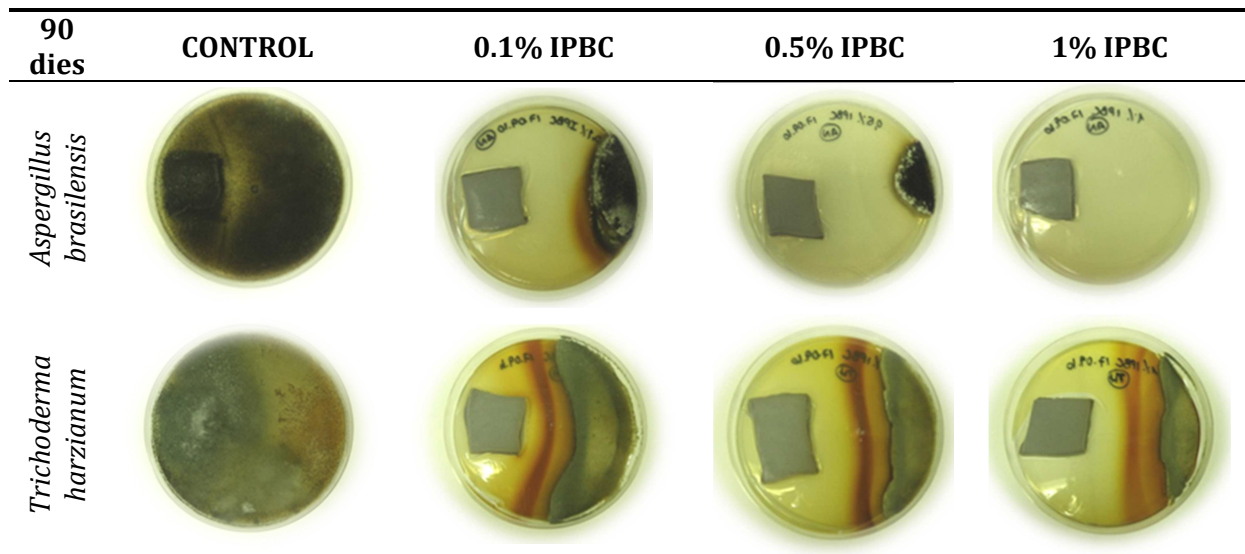
Imatge 6.2. Resultats de la capacitat fungicida de diferents ofertes de barreja de compostos fenòlics després de 90 dies d'incubació.

Amb l'oferta més baixa de DIMPTS (0.1% sobre pes de pell wet blue), s'inhibeix el creixement de les dues soques sobre la superfície de la mostra. El creixement de fongs només s'observa en el medi de cultiu. No obstant, la difusió que crea la mostra tractada amb fungicida és suficient per impedir l'avançament del fong cap a la pell. Una oferta de producte més elevada ofereix una protecció molt més forta, creant una zona d'inhibició molt més alta, però és completament innecessari (Imatge 6.3).

90 dies	CONTROL	0.1% DIMPTS	0.5% DIMPTS	1% DIMPTS
<i>Aspergillus brasiliensis</i>				
<i>Trichoderma harzianum</i>				

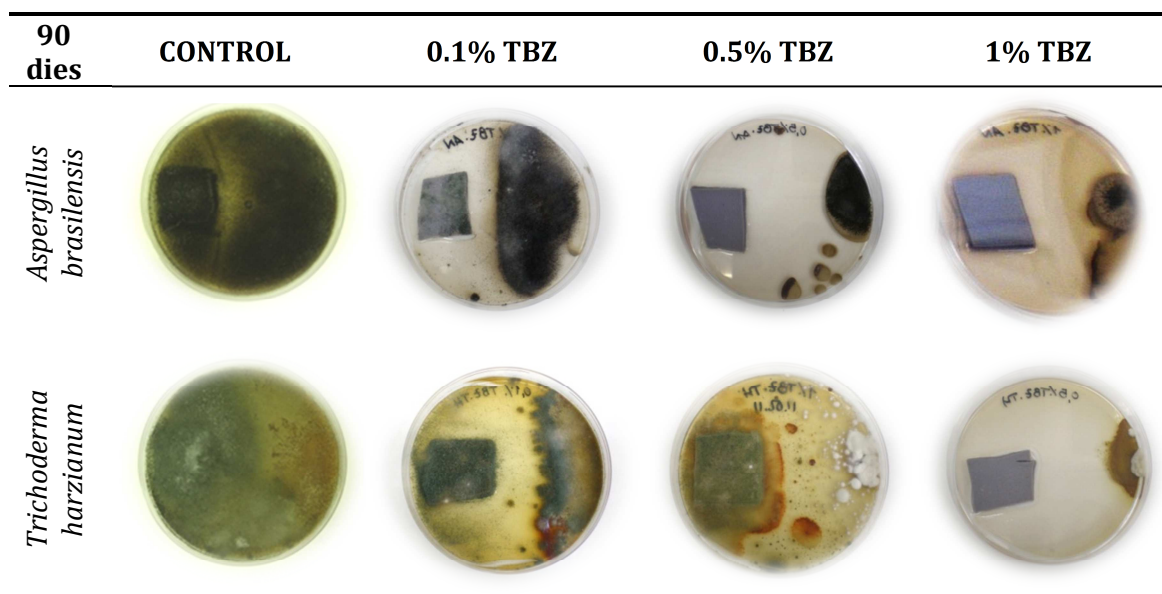
Imatge 6.3. Resultats de la capacitat fungicida de diferents ofertes de DIMPTS després de 90 dies d'incubació.

En el cas del IPBC, no s'observa creixement a la superfície de la pell wet blue en cap de les tres ofertes escollides. Per tant, una oferta del 0.1% sobre pes de pell wet blue és suficient per controlar el creixement de fong a la superfície de la pell. Una proposta deu vegades major (1%) impedeix completament el creixement de *Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088) inclús en l'agar de les plaques degut a l'efecte difusor que creen les mostres de pell tractades amb aquest producte. La Imatge 6.4 mostra els resultats obtinguts amb el IPBC.



Imatge 6.4. Resultats de la capacitat fungicida de diferents ofertes de IPBC després de 90 dies d'incubació

D'acord amb els resultats obtinguts pel TBZ, es confirma que l'aplicació d'aquesta molècula en adoberia no és molt eficient davant els fongs seleccionats, almenys la formulació comercial provada. Tot i que els resultats obtinguts de la CMI del producte mostren un fort efecte antifúngic, per un atac eficient contra els fongs, la pell necessitaria contenir una quantitat molt elevada de producte i això no és viable ni econòmic ni mediambientalment. El TBZ contra el *Trichoderma harzianum* (CECT 2423) és només efectiu amb una oferta de l'1% sobre pell wet blue mentre que un 0.5% de producte és suficient per evitar el creixement de l'*Aspergillus brasiliensis*. (CECT 2088) (Imatge 6.5)



Imatge 6.5. Resultats de la capacitat fungicida de diferents ofertes de TBZ després de 90 dies d'incubació

El tiabendazol està classificat entre els conservants que tenen acció fungistàtica, és a dir, que impedeixen o inhibeixen l'activitat vital dels fongs. És particularment efectiu davant el *Penicillium italicum* i el *Penicillium digitanum* (Seguer 2003). Aquests fongs són més característics del sector agrícola, i no es tractaran en aquest estudi.

Tot i que només es mostri una imatge de cada resultat, l'estudi s'ha realitzat per triplicat, i aquí es mostren les plaques més representatives de les 3 que s'han incubat en cada cas.

5.2. Estudi comparatiu amb un 0.2% de fungicida

A partir dels resultats obtinguts en l'apartat anterior, es realitza un estudi comparatiu amb un 0.2% de cadascun dels fungicides seleccionats junt amb un 100% d'aigua, sobre pes de pell wet blue.

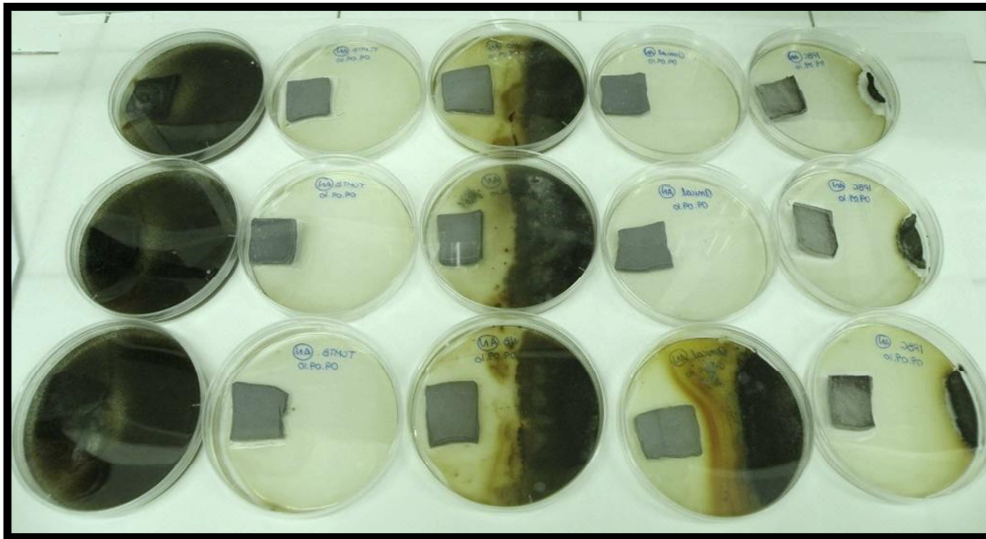
Es vol comprovar si aquesta proposta és suficient per evitar el creixement de fongs, no només a la superfície de la pell wet blue, si no també al seu voltant, i poder comparar l'efecte que exerceix aquesta quantitat d'antifúngic aplicat a la pell.

5.2.1. Resultats enfront l'*Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088)

En el cas de l'*Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088), una oferta del 0.2% de fungicida és suficient per evitar el creixement de soques a les mostres de pell i a les plaques, per tots els fungicides excepte per la barreja de compostos fenòlics.

Les pells del control, en dues setmanes ja han quedat completament recobertes per fongs, en canvi, les que se'ls ha afegit fungicida es resisteixen. Excepte les pells tractades amb la mescla de compostos fenòlics, totes les altres prevenen el creixement de soques a la pell. L'efecte difusor del TCMTB és suficient inclús per evitar el creixement de fongs en el medi de cultiu de les tres plaques. En el triplicat de la mescla de PCMC i OPP, totes les pells queden atacades pel creixement de les soques del fong.

A mode general, es confirma la bona activitat del TCMTB i dels fungicides alternatius davant l'*Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088). La imatge 6.6 reflecteix els resultats als 90 dies d'incubació.



Imatge 6.6. Creixement de l'*Aspergillus brasiliensis* als 90 dies d'incubació. Cada columna correspon a un fungicida diferent (oferta 0.2%). D'esquerra a dreta: control, TCMTB, fenòlics, DIMPTS i IPBC

En la Imatge 6.6 no apareixen les plaques amb el TBZ, ja que l'estudi s'ha realitzat uns dies posteriors i el creixement no ha estat paral·lel a la resta.

La Taula 6.5 mostra el % de superfície de pell recoberta per fongs. Com l'estudi s'ha fet per triplicat, els valors de la taula són la mitjana dels tres valors obtinguts.

% de superfície de pell coberta per l' <i>Aspergillus brasiliensis</i> CECT 2088						
Temps	Control	Oferta del 0.2% de fungicida aprox.				
		TCMTB	Fenòlics	DIMPTS	IPBC	TBZ
Inicial	0	0	0	0	0	0
2 setmanes	100	0	0	0	0	0
5 setmanes	100	0	7	0	0	0
8 setmanes	100	0	7	0	0	0
10 setmanes	100	0	7	0	0	0
90 dies	100	0	7	0	0	0

Taula 6.5. Mitjana de la superfície de pell recoberta per l'*Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088) en el transcurs de les setmanes

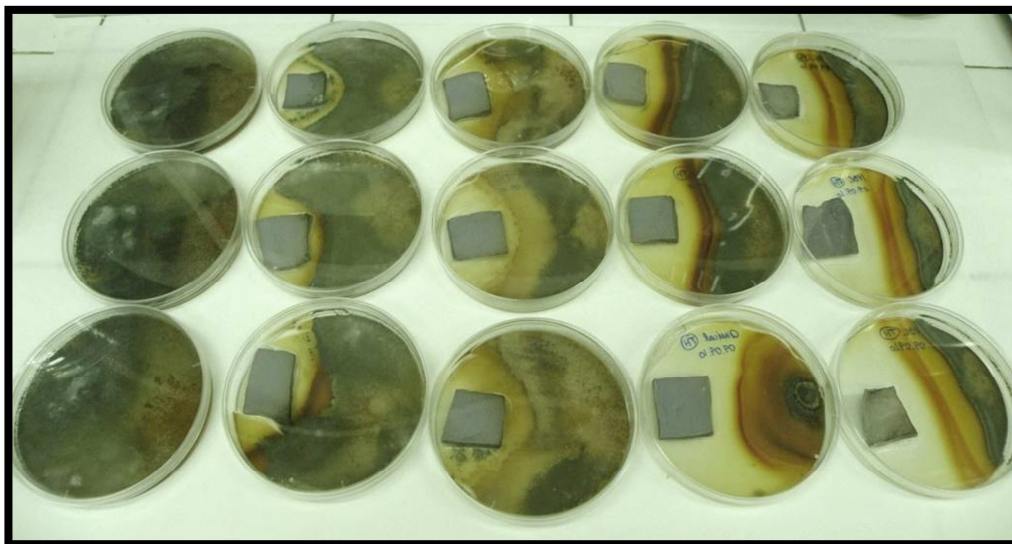
Binnur et al. (1997) afirmaven que, en general, la protecció del TCMTB era major que la de la barreja de compostos fenòlics. Fet que es confirma en l'aplicació del fungicida directament sobre pell wet blue, en el cas de l'*A.brasiliensis*.

5.2.2. Resultats enfront el *Trichoderma harzianum* (CECT 2423)

Quan l'estudi es realitza utilitzant el *Trichoderma harzianum* (CECT 2423), els fungicides alternatius DIMPTS i IPBC eviten el creixement del fong sobre la superfície de la pell, i a més són els que provoquen una zona d'inhibició més extensa sobre el medi de cultiu. No obstant, tant pel TBZ com pels fungicides convencionals (TCMTB i barreja de fenòlics), el 0.2% de producte no és suficient per impedir el progrés de les hifes a través de la pell wet blue, i evitar que aquesta quedi recoberta per fong. La Taula 6.6 mostra els resultats obtinguts en l'estudi comparatiu per aquest tipus de fong.

% de superfície de pell coberta pel <i>Trichoderma harzianum</i> CECT 2423						
Temps	Control	Oferta del 0.2% de fungicida aprox.				
		TCMTB	Fenòlics	DIMPTS	IPBC	TBZ
Inicial	0	0	0	0	0	0
2 setmanes	100	0	0	0	0	0
5 setmanes	100	5	0	0	0	46
8 setmanes	100	13	3	0	0	100
10 setmanes	100	20	5	0	0	100
90 dies	100	30	5	0	0	100

Taula 6.6. Mitjana de la superfície de pell recoberta pel *Trichoderma harzianum* (CECT 2423) en el transcurs de les setmanes



Imatge 6.7. Creixement del *Trichoderma harzianum* als 90 dies d'incubació. Cada columna correspon a un fungicida diferent (oferta 0.2%). D'esquerra a dreta: control, TCMTB, fenòlics, DIMPTS i IPBC

El *Trichoderma harzianum* és un dels fongs més difícils de combatre pel TCMTB. És molt comú en fusta i els palets utilitzats en les adoberies podria ser l'origen de la seva presència a la pell. (Kennedy 2004)

Com en el cas anterior, en la Imatge 6.7 no apareixen les plaques amb el TBZ ja que l'estudi s'ha realitzat en dies posteriors i el creixement no ha estat paral·lel a la resta.

6. Conclusions

Dels fungicides utilitzats convencionalment en les adoberies i que s'han estudiat en aquest treball, el 2-(tiocianometiltio)-1,3-benzotiazol (TCMTB) mostra la capacitat antifúngica més elevada enfront els fongs escollits per fer l'estudi. Tot i que un 0.2% és suficient per evitar el creixement de l'*Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088) en placa, aquesta concentració no és efectiva contra el *Trichoderma harzianum* (CECT 2423). Per altra banda, se'n necessita més d'un 0.2% de la barreja de compostos fenòlics (p-cloro-m-cresol, PCMC, i o-fenilfenol, OPP) per evitar la invasió de la pell per part dels dos fongs testats.

Les mínimes ofertes treballades (un 0.1%) de dos dels tres fungicides alternatius aquí analitzats (diiodometil-p-tolilsulfona, DIMPTS, i 3-iodo-2-propinil-N-butilcarbamat, IPBC) confereixen una resistència satisfactòria evitant el creixement de l'*A.brasiliensis* i el *T.harzianum* a les mostres de pell wet blue tractades, tal i com mostren els resultats de percentatge de creixement sobre la superfície i la zona d'inhibició. Pel que fa al tiabendazol (TBZ), la formulació comercial provada resulta ineficient davant els fong seleccionats, almenys en les ofertes més baixes (0.1 - 0.2 - 0.5%) aplicades en les proves.

Els resultats obtinguts confirmen que el DIMPTS i el IPBC són uns bons candidats com a fungicides alternatius per usar en la indústria de la pell. No obstant això, el seu potencial d'aplicació s'ha de provar utilitzant un espectre més ampli de fongs, especialment en fongs aïllats d'adoberies, i demostrar que també són eficients aplicats en condicions reals de treball de les adoberies, no només a microescala. Aquestes proves constituïran part dels pròxims capítols de la tesi, junt amb l'avaluació de la toxicitat associada a la seva aplicació.

CAPÍTOL 7(I)

APLICACIÓ DE FUNGICIDES EN ADOBAMENT AL CROM

1. Introducció

La protecció de la pell en estat wet blue davant l'atac dels fongs és un dels principals objectius a assolir en aquesta tesi, tal i com s'ha vist en el Capítol 6. Estudiar l'efecte antifúngic dels diferents compostos assajats aplicats en un adobament al crom, serà un dels principals objectius d'aquest capítol, junt amb altres estudis complementaris.

Les pells wet blue són un excel·lent substrat pel creixement de fongs: la temperatura d'emmagatzematge, el pH àcid, la presència d'aigua, proteïnes i greixos, constitueixen les condicions més importants pel desenvolupament i creixement d'un gran nombre de soques com *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp* i el *Trichoderma harzianum*. (Padoan 2006)

2. Objectius

L'objectiu principal és avaluar la capacitat fungicida del DIMPTS, del IPBC i del TBZ en l'adobament al crom, enfront a diferents soques de fongs. La capacitat fungicida d'aquests compostos es compararà amb la del TCMTB i amb la barreja de compostos fenòlics.

En aquesta part del treball s'aplicaran els fungicides en un adobament al crom de pell vacuna, en bombos de laboratori. Els anàlisis posteriors consistiran en realitzar un control microbiològic de inoculació de la pell tant davant de les soques adquirides com de les soques aïllades en fàbriques adoberes.

Una segona part d'aquest capítol serà aplicar diferents quantitats dels dos fungicides proposats (DIMPTS i IPBC) en l'adobament al crom per determinar la quantitat mínima necessària que caldria afegir en aquest procés per conferir la protecció adequada davant els diferents fongs utilitzats.

3. Material i reactius

La Taula 7.1 mostra els fungicides utilitzats en aquesta part de l'estudi.

FUNGICIDA	NOM	% PRINCIPI ACTIU
TCMTB	2-(tiocianometiltio)-1,3-benzotiazol	30%
Fenòlics (PCMC+OPP)	p-cloro-m-cresol + o-fenilfenol	42%
DIMPTS	Diodometil-p-tolilsulfona	40%
IPBC	3-iodo-2-propinil-N-butilcarbamat	40%
TBZ	Tiabendazol	60%

Taula 7.1. Fungicides utilitzats en l'estudi del Capítol 7(I)

L'acció fungicida dels tres compostos alternatius seleccionats s'ha comparat amb l'eficàcia contrastada del TCMTB i amb la barreja de compostos fenòlics (PCMC i OPP), els productes més utilitzats actualment en la indústria adobera.

Els fongs usats (tant adquirits com aïllats) amb els quals es fa el control de creixement s'indiquen en la Taula 7.2.

MICROORGANISME	nº COL·LECCIÓ
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	CECT 2088
<i>Trichoderma harzianum</i>	CECT 2423
<i>Penicillium spinulosum</i> (QF01)	Soques aïllades
<i>Penicillium decumbens</i> (QF02)	(veure Capítol 4)
<i>Trichoderma harzianum</i> (LL01)	

Taula 7.2. Nom i número de col·lecció dels fongs utilitzats en l'estudi del Capítol 7(I)

De cadascun dels fongs es necessita suspensió d'espores amb solució Ringer, de l'ordre de 10^5 esp./mL (veure Capítol 3, apartat 4.1.).

Per a la realització de totes les proves s'ha partit de pell vacuna de 32kg+, procedents de França, en estat de píquel i dividides en tripa a 3.3mm.

Abans de començar, de cada pell rebuda s'ha realitzat una extracció amb acetonitril per determinar possibles restes de fungicida de processos anteriors utilitzant el mètode EN ISO

13365 (veure Capítol 3, apartat 4.3.). D'aquesta manera, es pot assegurar que les pells no contenen cap tipus de producte que pugui interferir en els resultats.

4. Part experimental

4.1. Aplicació de 0.2% de fungicida en bombos de laboratori

Es fracciona una pell en cinc parts iguals, per treballar amb els cinc fungicides escollits (Taula 7.1). Cada fracció s'adoba en un bombo de laboratori diferent, seguint la recepta de la Taula 7.3. Es reserva una sisena part per fer un adobat al crom sense addició de cap fungicida, per utilitzar la pell com a control.

Adobament al crom	
60% H ₂ O	
4% clorur de sodi	
4% sal de crom 33% basicitat	Rodar 60'
0.1% fungicida	Rodar 60'
4% sal de crom 33% basicitat	Rodar 3h
1% formiat de sodi	Rodar 3h
Nit en repòs	
Controlar el pH (entre 2,8 – 3)	
1-1.5% bicarbonat de sodi	Rodar 90'
Controlar el pH (entre 3,5 – 4)	
0.1% fungicida	Rodar 60'
Escórrer - buidar	
100% H ₂ O	Rodar 15'
Escórrer - buidar	

Taula 7.3. Adobament al crom (% sobre pes de pell tripa)

De cada exemplar adobat es reserva:

Mostra de pell humida Una mostra de pell wet blue humida per realitzar-hi el control de creixement de fongs. Conservada a 4°C.

Mostra de pell seca Una mostra de pell seca per determinar estratigràficament el contingut de fungicida a cada capa. Conservada a temperatura ambient. (*Procediment i resultats en el Capítol 10*)

Banys residuals Els banys residuals per determinar la toxicitat produïda per l'addició dels productes en cada cas. (*Procediment i resultats en el Capítol 11*)

4.1.1. Control de creixement de fongs sobre la pell adobada al crom

De les mostres de pell wet blue conservades humides, es realitza un control de creixement de fongs per cadascuna de les cinc soques escollides (Taula 7.2). S'efectua l'estudi per triplicat seguint la norma ASTM D4576-01 (*veure Capítol 3, apartat 4.2.*). El creixement es controla enfront un blanc (control), una pell de les mateixes característiques que la resta, a la que no se li ha afegit fungicida.

S'emmagatzemen les plaques a la càmera climatitzada (*veure Capítol 3, apartat 3.9*) a 26°C durant 90 dies i es realitza la lectura de resultats setmanalment, comparant amb el blanc.

4.2. Aplicació de diferents quantitats de fungicida

Després de comprovar que la pell que s'ha d'utilitzar no conté productes antifúngics residuals de processos anteriors, es fracciona en nou parts iguals. S'adoba cada fracció en un bombo diferent segons la fórmula de la Taula 7.4.

Adobament al crom	
60% H ₂ O	
4% clorur de sodi	
4% sal de crom 33% basicitat	Rodar 60'
(X/2) % fungicida	Rodar 60'
4% sal de crom 33% basicitat	Rodar 3h
1% formiat de sodi	Rodar 3h
Nit en repòs	
Controlar el pH (entre 2,8 – 3)	
1.5% bicarbonat de sodi	Rodar 90'
Controlar el pH (entre 3,5 – 4)	
(X/2) % fungicida	Rodar 60'
Escórrer - buidar	
100% H ₂ O	Rodar 15'
Escórrer - buidar	

Taula 7.4. Fórmula de l'adobament al crom de la pell amb diferents quantitats de fungicida. (% sobre pes de pell piquelada)

Una mostra es reserva per a realitzar una adobament al crom sense cap producte fungicida afegit (blanc-control). A les vuit mostres restants se'ls apliquen quatre percentatges diferents (C1 – C4) dels dos compostos fungicides seleccionats per aquesta part de l'estudi; DIMPTS i IPBC, que són els productes fungicides alternatius que donen millor resultat. Les diferents quantitats de fungicida afegit (X) es mostren a la Taula 7.5.

Mostra	Fungicida	Mostra	Fungicida	% fungicida
M1	C1 - DIMPTS	M5	C1 - IPBC	0.12
M2	C2 - DIMPTS	M6	C2 - IPBC	0.16
M3	C3 - DIMPTS	M7	C3 - IPBC	0.20
M4	C4 - DIMPTS	M8	C4 - IPBC	0.24

Tabla 7.5. Diferents quantitats de fungicida afegit en l'adobament al crom

De cada exemplar adobat al crom es reserva:

Mostra de pell humida Una mostra de pell wet blue humida per realitzar el control de creixement de fongs a la pell. Conservada a 4°C.

També es guarda una mostra de pell seca per determinar el contingut total de fungicida a la pell. Es conserva a temperatura ambient. Els resultats s'inclouen en l'Annex E.

4.2.1. Control de creixement de fongs sobre la pell adobada al crom

De les mostres de pell wet blue conservades humides, es realitza un control de creixement de fongs per tres de les cinc soques escollides (Taula 7.6). Com en el cas anterior (*apartat 4.1.1.*), s'efectua l'estudi per triplicat sobre plaques estèrils amb medi de cultiu agar de patata, seguint la norma ASTM D4576-01 (*veure Capítol 3, apartat 4.2.*).

MICROORGANISME	nº COL·LECCIÓ
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	CECT 2088
<i>Trichoderma harzianum</i>	CECT 2423
<i>Penicillium spinulosum (QF01)</i>	(<i>veure Capítol 4</i>)

Taula 7.6. Nom i número de col·lecció dels fongs utilitzats a l'apartat 4.2, del Capítol 7(I)

Les plaques resten durant 90 dies emmagatzemades a la càmera climatitzada (*veure Capítol 3, apartat 3.9.*), a 26°C, en atmosfera humida, i la lectura de resultats es fa setmanalment.

5. Resultats

5.1. Aplicació de 0.2% de fungicida en bombos de laboratori

5.1.1. Control de creixement de fongs sobre la pell adobada al crom

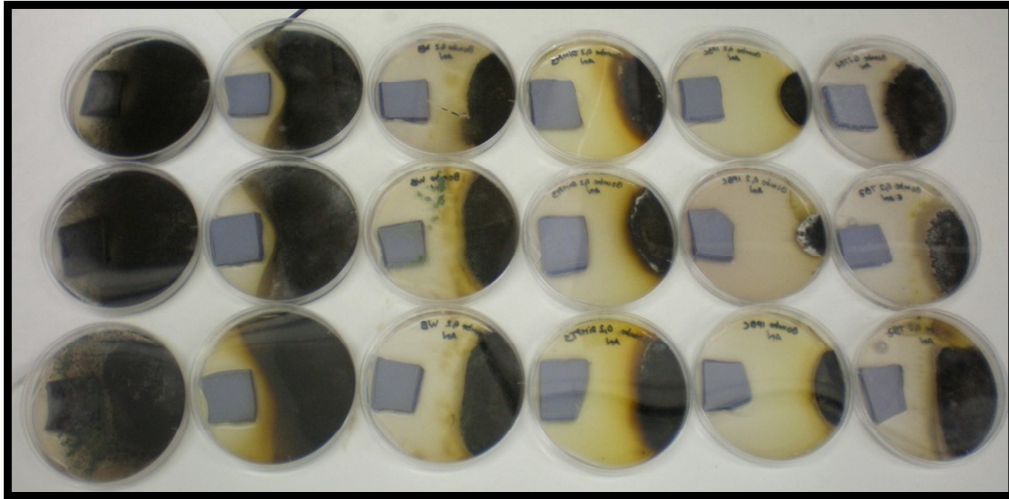
Els resultats obtinguts mostren que amb DIMPTS i IPBC (dos dels tres fungicides alternatius proposats) no existeix creixement de cap de les soques sobre la pell, i la zona d'inhibició que provoquen és major que la resta. El TBZ, així como els fungicides convencionals, no té suficient capacitat antifúngica per evitar la contaminació de les mostres (Taula 7.7). Els estudis s'han realitzat per triplicat i els valors de la taula són la mitjana dels tres casos. Tots els valors anotats i la desviació estàndard calculada de tots ells s'inclouen en l'Annex D.

FUNGICIDA	<i>Aspergillus brasiliensis</i> CECT 2088		<i>Trichoderma harzianum</i> CECT 2423		<i>Penicillium spinulosum</i> QF01		<i>Penicillium decumbens</i> QF02		<i>Trichoderma harzianum</i> LL01	
	CS	ZI	CS	ZI	CS	ZI	CS	ZI	CS	ZI
CONTROL	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
TCMTB	0	4	0.6	1.3	100	0	50	0	30	0
Fenòlics	0	5	13	0.7	100	0	38	0	6	0
DIMPTS	0	22	0	6	0	14	0	8	0	12
IPBC	0	35	0	26	0	28	0	33	0	29
TBZ	73	2	100	0	80	0	100	0	90	0

Taula 7.7. Resultats de Creixement en Superfície (CS – expressat en %) i zona d'inhibició (ZI – expressat en mm) per les mostres de pell wet blue, als 90 dies de control

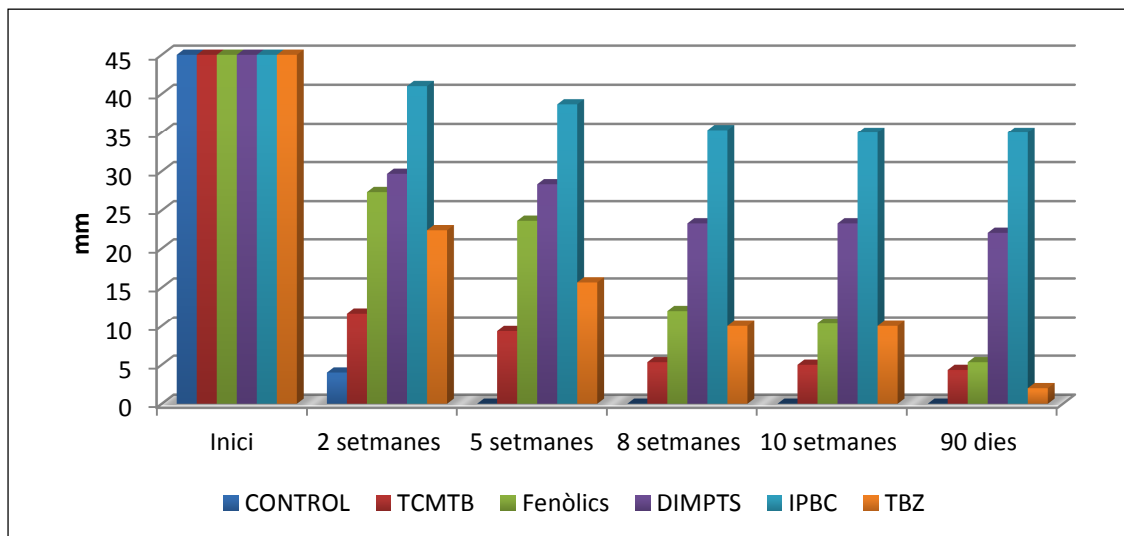
Excepte pel TBZ, tots els altres fungicides inhibeixen el creixement de soques aïllades (veure Capítol 4) a la superfície de la pell, la diferència entre la protecció d'uns i altres està en la zona d'inhibició projectada. Aquest és un clar exemple de la introducció del paràmetre "Zona d'Inhibició" per diferenciar les mostres on el creixement de fongs a la superfície és 0%. La zona d'inhibició del TCMTB i la barreja de fenòlics és mínima, encara que suficient com per protegir la pell. El DIMPTS i el IPBC són els que presenten un halo d'inhibició major. En el cas del TBZ, es manté una petita zona d'inhibició, però la pell està contaminada per la soca.

Els resultats respecte *l'Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088) es mostren a la Imatge 7.1. Cada columna correspon a un fungicida diferent, ja que les proves, com ja s'ha comentat, s'han realitzat per triplicat.



Imatge 7.1. Control de creixement de *l'Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088) sobre pell wet blue després de 90 dies d'incubació. Columna d'esquerra a dreta: Control, TCMTB, Fenòlics, DIMPTS, IPBC i TBZ

Els resultats es representen de forma més clara amb una gràfica de l'evolució de la zona d'inhibició al llarg dels 3 mesos davant *l'Aspergillus brasiliensis* (Gràfica 7.1).

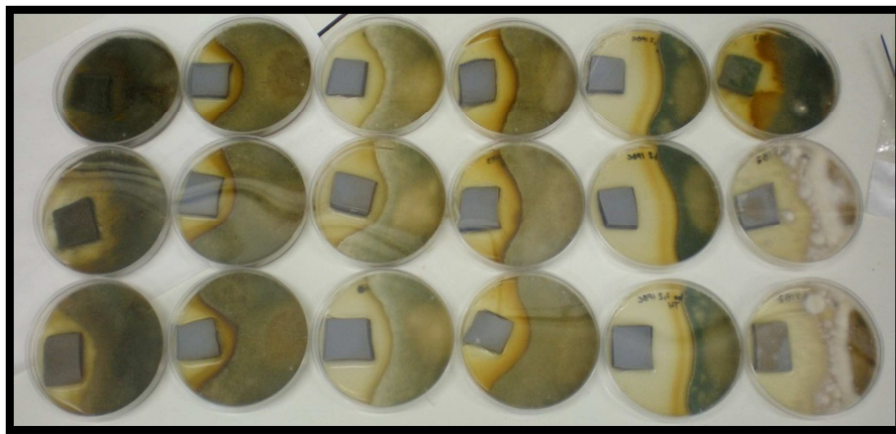


Gràfica 7.1. Evolució de la Zona d'Inhibició (ZI) enfront *l'Aspergillus brasiliensis* durant 90 dies

La columna que correspon al control desapareix després de dues setmanes, la resta es van reduint al llarg del temps a diferents velocitats, destacant que el DIMPTS i el IPBC són els que menor reducció han patit passats els 90 dies.

A la Imatge 7.2 s'observa el resultat pel *Trichoderma harzianum* (CECT 2423). Es destaca el creixement de les soques a les plaques on la pell conté TBZ, ja que és diferent a la resta. Això indica que el fungicida també pot afectar al cicle biològic dels fongs.

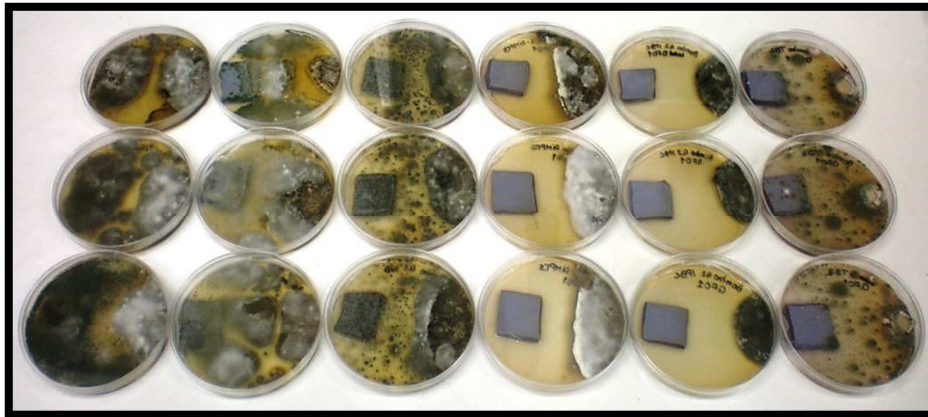
Les dues úniques mostres que no han presentat creixement del *T.harzianum* (CECT 2423) a la pell han estat les mostres tractades amb DIMPTS i IPBC, aquest últim amb una zona d'inhibició al seu voltant molt superior a la resta. El fong ha atacat les altres pells tractades, però és amb el TBZ on la protecció és completament ineficaç ja que les mostres han resultat 100% contaminades en els tres replicats.



Imatge 7.2. Control de creixement del *T.harzianum* (CECT 2423) sobre pell wet blue després de 90 dies d'incubació. Columna d'esquerra a dreta: Control, TCMTB, Fenòlics, DIMPTS, IPBC i TBZ

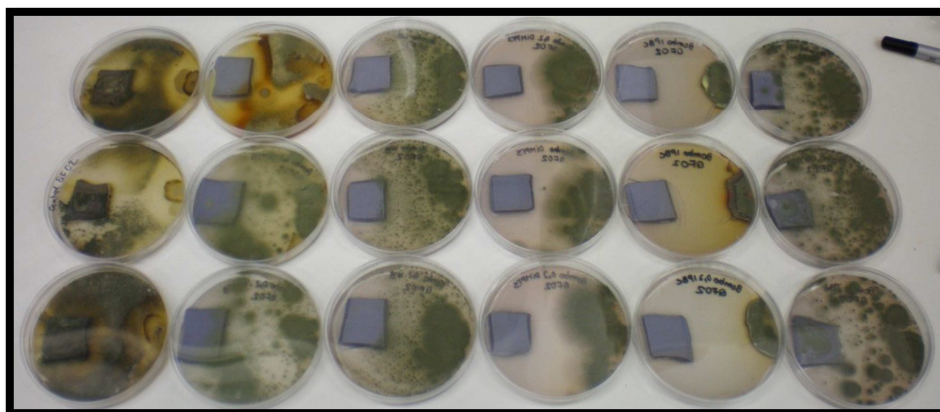
La Imatge 7.3 mostra el control de creixement de les mostres enfront la soca *Penicillium spinulosum* (QF01). S'observa perfectament com les pells amb DIMPTS i IPBC, a diferència de la resta, eviten el creixement de fongs a la superfície i eludeixen que aquests creixin al seu voltant, creant una efectiva zona d'inhibició.

Pels dos fungicides convencionals, el 100% de les mostres de pell han quedat completament contaminades d'aquest fong, i el 80% utilitzant el TBZ com a antifúngic.



Imatge 7.3. Control de creixement del *Penicillium spinulosum* (QF01) sobre pell wet blue després de 90 dies d'incubació. Columna d'esquerra a dreta: Control, TCMTB, Fenòlics, DIMPTS, IPBC i TBZ

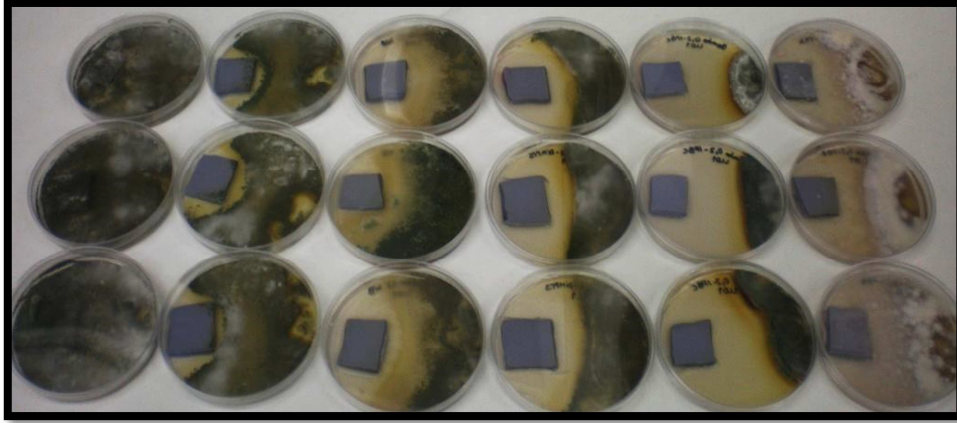
Així com en el cas anterior, per la soca *Penicillium decumbens* (QF02), existeix una clara diferència entre les mostres tractades amb els productes convencionals i les mostres tractades amb dos dels fungicides proposats com alternatius (DIMPTS i IPBC). El TBZ, en aquest cas, és el que protegeix en menor mesura la pell (Imatge 7.4).



Imatge 7.4. Control de creixement del *Penicillium decumbens* (QF02) sobre pell wet blue després de 90 dies d'incubació. Columna d'esquerra a dreta: Control, TCMTB, Fenòlics, DIMPTS, IPBC i TBZ

La manera d'actuar del *Trichoderma harzianum* (LL01) aïllat de fàbrica és molt semblant als anteriors casos amb els altres dos fongs aïllats. La protecció completa de la pell s'aconsegueix amb el DIMPTS i el IPBC. El TBZ resulta completament ineficaç per aquestes soques, i el creixement del fong en aquestes plaques és diferent. El TCMTB i la mescla de fenòlics no són suficients per evitar l'atac dels fongs a la pell (Imatge 7.5).

Una de les raons per que el TCMTB no és completament efectiu davant les soques descrites podria ser la possible degradació del producte a MBT (2-mercaptobenzotiazol) una molècula fungicida, però amb una eficàcia molt menor. (Padoan 2006)



Imatge 7.5. Control de creixement del Trichoderma harzianum (LL01) sobre pell wet blue després de 90 dies d'incubació. Columna d'esquerra a dreta: Control, TCMTB, Fenòlics, DIMPTS, IPBC i TBZ

És important destacar que la manera d'actuar dels fongs aïllats mostra que aquests posseeixen una resistència adquirida als fungicides convencionals utilitzats en les adoberies. Són resultat de sobreviure a aquest tipus de productes (Imatges 7.3, 7.4, 7.5).

Una de les propostes de Orlita (2004) era afegir fungicida en el píquel anterior a l'adobament i a l'adobament al crom. D'aquesta manera s'allargava més el temps que podia restar la pell emmagatzemada sense contaminar-se.

5.2. Aplicació de diferents quantitats de fungicida

Aquesta part de l'estudi s'ha realitzat només pels dos fungicides proposats com alternatius que han donat millor resultat, el DIMTSP i el IPBC. S'ha descartat el TBZ degut a la mala protecció que confereix a la pell wet blue.

5.2.1. Control de creixement de fongs sobre la pell adobada al crom

La Taula 7.8 mostra el percentatge de creixement de fong sobre la pell wet blue i la zona d'inhibició que crea el fungicida al seu voltant per les diferents concentracions de fungicida aplicat. Tots els valors determinats, junt amb la mitjana i la desviació estàndard, s'inclouen en l'Annex D.

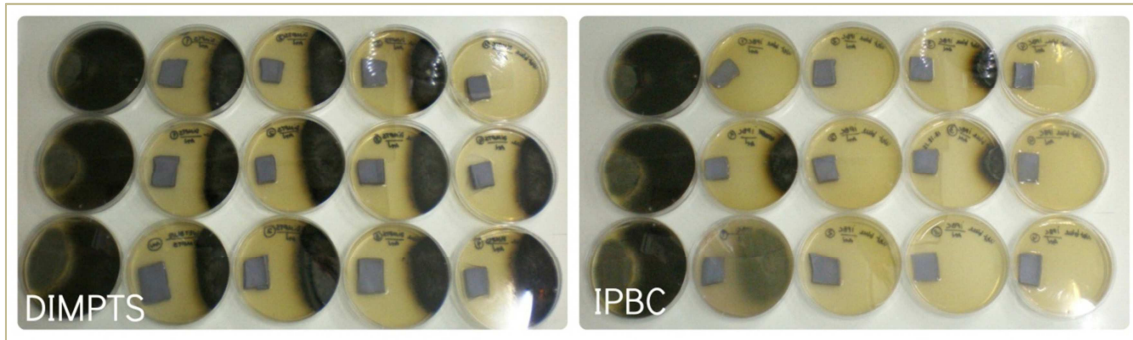
Wet Blue		<i>Aspergillus brasiliensis</i> CECT 2088		<i>Trichoderma harzianum</i> CECT 2423		<i>Penicillium spinulosum</i> QF01	
DIMPTS		CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)
C0	Control	100	0	100	0	100	0
C1	0.12	0	22	0	13	0	18
C2	0.16	0	21	0	12	0	14
C3	0.20	0	20	0	15	0	14
C4	0.24	0	29	0	14	0	18
IPBC		CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)
C0	Control	100	0	100	0	100	0
C1	0.12	0	27	37	0	13	6
C2	0.16	0	45	0	12	0	20
C3	0.20	0	39	0	23	0	32
C4	0.24	0	45	0	20	0	38

Taula 7.8. Resultats de Creixement en Superfície (CS) i Zona d'Inhibició (ZI) per les mostres de pell wet blue, amb diferents quantitats de fungicida (DIMTPTS i IPBC), passats 90 dies de control.

Les mostres sense fungicida afegit queden completament contaminades dues setmanes després de la sembra. En el cas del DIMTPTS, la mínima concentració aplicada (un 0.12%) és suficient per inhibir el creixement dels tres fongs escollits sobre la pell. Amb l'*Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088), també és suficient la mínima concentració afegida de IPBC (0.12%), en canvi, la inhibició del creixement del *Trichoderma harzianum* (CECT 2423) i del *Penicillium spinulosum* (QF01) s'aconsegueix amb la segona concentració assajada (un 0.16%).

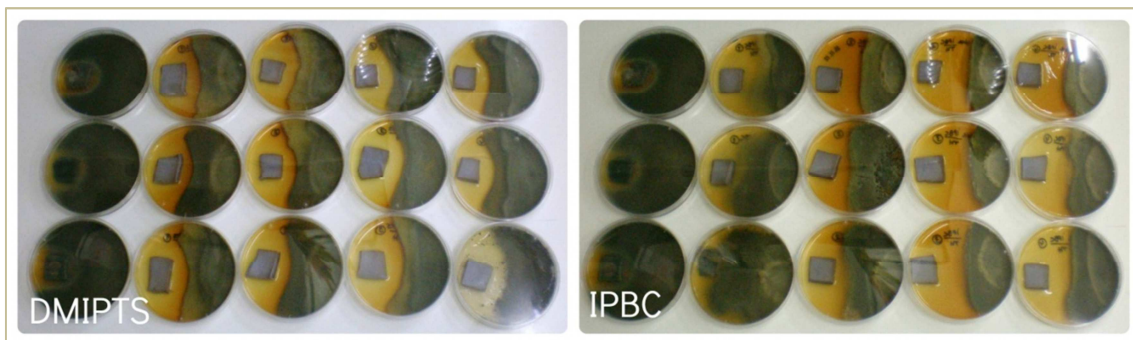
Les Imatges 7.6, 7.7 i 7.8 mostren el control de creixement de fongs als 90 dies d'incubació. Cada columna de plaques de les fotografies correspon a una concentració de fungicida diferent, sent la primera el control (sense fungicida). En algunes de les imatges s'observa perfectament com les diferents concentracions exerceixen diferents efectes davant les soques. Com més gran és la concentració aplicada, millor evita el creixement de fongs en la pell wet blue i impedeix que aquests creixin al seu voltant, creant un efectiu halo d'inhibició.

L'halo d'inhibició del IPBC aplicat evita el creixement de l'*Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088) inclús a l'agar de les plaques (Imatge 7.6).



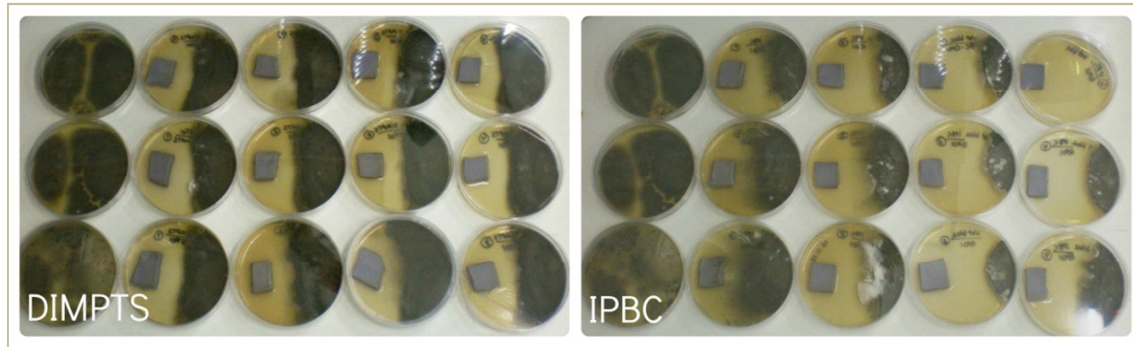
Imatge 7.6. Creixement de l'*Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088) sobre diferents concentracions de DIMPTS i IPBC, en adobament al crom. En cada cas, columna d'esquerra a dreta: control, 0.12%, 0.16%, 0.20%, 0.24% de fungicida

Davant el *Trichoderma harzianum* (CECT 2423), un 0.12% de DIMPTS és suficient per evitar el creixement de fongs a les mostres. Però en caldria un mínim de 0.16% de IPBC per evitar l'atac (Imatge 7.7).



Imatge 7.7. Creixement del *Trichoderma harzianum* (CECT 2423) sobre diferents concentracions de DIMPTS i IPBC, en adobament al crom. En cada cas, columna d'esquerra a dreta: control, 0.12%, 0.16%, 0.20%, 0.24% de fungicida

La mínima quantitat de DIMPTS aplicada evita el creixement del *Penicillium spinulosum* (QF01) a les pells. En el cas del IPBC, un 0.16% és el mínim percentatge que s'hauria d'aplicar a l'adobament al crom per evitar l'atac per part de les soques (Imatge 7.8).



Imatge 7.8. Creixement del *Penicilium spinulosum* (QF01) sobre diferents concentracions de DIMPTS i IPBC, en adobament al crom. En cada cas, columna d'esquerra a dreta: control, 0.12%, 0.16%, 0.20%, 0.24% de fungicida

Tots aquests percentatges de fungicida aplicats estan calculats sobre pes de pell piquelada. Sabent que 1kg de pell piquelada equival a una mitjana de 1.5kg de pell tripa per una pell d'aquestes característiques (segons experiència dels tècnics de l'empresa subministradora de les pells), l'equivalència resultant es mostra a la Taula 7.9.

Concentracions	% fungicida sobre pes píquel	% fungicida sobre pes tripa
C1	0.12	0.08
C2	0.16	0.11
C3	0.20	0.13
C4	0.24	0.16

Taula 7.9. Equivalència aproximada entre els percentatges calculats sobre pes de pell píquel i sobre pes de pell tripa per la pell utilitzada.

6. Conclusions

Les soques aïllades de les adoberies revelen una gran resistència als fungicides, en especial als productes utilitzats convencionalment. Això pot ser degut a que aquestes espècies de fongs posseeixen una resistència adquirida a aquests compostos.

La gran capacitat antifúngica de dos dels tres fungicides alternatius proposats, DIMPTS (diiodometil-p-tolilsulfona) i IPBC (3-iodo-2-propinil-N-butilcarbamat) aplicats en l'adobament al crom confirmen que es poden utilitzar en aquest procés de la producció de pell. L'altre compost alternatiu, TBZ (tiabendazol), no posseeix la suficient capacitat antifúngica per prevenir la contaminació en les mostres wet blue.

En el cas del DIMPTS i el IPBC, un 0.2% de producte antifúngic sobre pes de pell tripa prevé l'atac de la pell per part dels fongs utilitzats en aquest estudi i, a més, projecta una elevada zona d'inhibició al voltant de les mostres. A aquesta mateixa dosis, els fungicides convencionals (TCMTB i mescla de compostos fenòlics) i el TBZ només protegeixen la pell davant d'una de les cinc soques escollides (*Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088)). Per la resta de fongs, un 0.2% de producte no és suficient.

Acotant més el percentatge, i parlant sobre pes de pell piquelada, un 0.12% de DIMPTS protegeix la pell respecte *Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088), el *Trichoderma harzianum* (CECT 2423) i el *Penicillium spinulosum* (QF01). Un 0.16% de IPBC assegura la protecció de les mostres en tots tres casos.

CAPÍTOL 7(II)

APLICACIÓ DE FUNGICIDES EN ADOBAMENT AL CROM

1. Introducció

La primera part del capítol estudia la protecció de la pell en estat wet blue, aplicant el fungicida en l'adobament al crom. L'elevada protecció que confereixen dos dels quatre fungicides alternatius escollits en aquest treball condueix a analitzar si l'aplicació d'aquests compostos afecten a la qualitat final del producte.

2. Objectius

L'objectiu principal del Capítol 7 és avaluar la capacitat fungicida del DIMPTS i del IPBC en adobament al crom, davant diferents soques de fongs.

Aquesta segona part del capítol completa els estudis per a pell wet blue. Es realitzarà un procés d'adobament al crom de dues pells vacunes, cadascuna amb un fungicida diferent, des del remull fins a la tintura, en planta pilot. D'aquesta manera es podrà comprovar si l'aplicació dels fungicides alternatius afecten a la qualitat del producte final.

3. Material i reactius

En aquesta part de l'estudi només es treballa amb dos fungicides (Taula 7.10).

FUNGICIDA	NOM	% PRINCIPI ACTIU
DIMPTS	Diiodometil-p-tolilsulfona	40%
IPBC	3-iodo-2-propinil-N-butylcarbamat	40%

Taula 7.10. Fungicides utilitzats en l'estudi del Capítol 7(II)

Els fongs enfront dels quals es va fer el control de creixement s'indiquen en la Taula 7.11.

MICROORGANISME	nº COL·LECCIÓ
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	CECT 2088
<i>Trichoderma harzianum</i>	CECT 2423
<i>Penicillium spinulosum</i> (QF01)	
<i>Penicillium decumbens</i> (QF02)	Soques aïllades
<i>Trichoderma harzianum</i> (LL01)	(veure Capítol 4)

Taula 7.11. Nom i número de col·lecció dels fongs utilitzats

De cadascun d'ells s'ha utilitzat suspensió d'espores titulada en 10^5 esp./mL (veure Capítol 3, apartat 4.1).

Per les proves s'ha emprat una pell vacuna, semi-piquelada, amb un pes d'uns 15kg aproximadament.

4. Part experimental

4.1. Procés d'adobament d'una pell vacuna en planta pilot

Es parteix d'una pell vacuna amb un píquel molt suau. Per una pell d'aquestes característiques es considera que la relació entre pes de pell piquelada i pes de pell tripa és de 1:1 aproximadament. El primer que es fa és partir aquesta pell per l'espina per obtenir dues fulles el més semblants possibles. Cada fulla pesa 7.5kg, i aquest és el pes que s'agafa per fer els càlculs dels productes a aplicar en la primera part del procés.

Es treballa en dos bombos diferents, un per cada fulla. El primer pas és tornar a piquelar cada mostra per assegurar un bon píquel. Les quantitats de productes que s'afegeixen a cada fulla es mostren a la Taula 7.12.

Re-piquelat	
500g clorur de sodi	
400g H ₂ O + 50g àcid fòrmic	
150g clorur de sodi	Rodar 30'
Escórrer - buidar	

Taula 7.12. Productes aplicats en el re-píquel (pesos calculats sobre 7.5kg de pell a cada bombo)

A continuació es fa l'adobament (Taula 7.13). En aquesta part és on hi ha l'addició de fungicida; a cadascun dels bombos s'afegeix un fungicida diferent dels dos nombrats a la Taula 7.10.

Adobament al crom	
60% H ₂ O	
4% clorur de sodi	Rodar 10'
4% sal de crom 33% basicitat	Rodar 60'
0.1% fungicida	Rodar 60'
4% sal de crom 33% basicitat	Rodar 3h
1% formiat de sodi	Rodar 3h
Comprovar la penetració amb un tall a la pell	
Nit en repòs	
Comprovar pH (entre 2,8 - 3)	
1% bicarbonat de sodi	Rodar 2h
Comprovar pH (entre 3,5 - 4)	
0.1% fungicida	Rodar 60'
Escórrer - buidar	
Deixar les pells en cavallet	12h

Taula 7.13. Recepta de l'adobament al crom (% sobre pes de pell piquelada)

Després de l'adobament al crom, es reserva una mostra de pell de cada bombo, per fer-hi el control de creixement de fongs, i aquesta es conserva humida (*apartat 4.1.*).

Amb la resta de pell es continua amb el procés. Els següents passos són; escórrer i rebaixar la pell fins a un espessor de 1.7-1.8 mm, amb les màquines corresponents.

Un cop rebaixades, es tornen a pesar (4.5kg/cadascuna) i sobre aquest pes es fan els càlculs dels percentatges de les següents operacions.

Tot seguit, es fa un rentat per eliminar restes de rebaixadures i posteriorment la neutralització. Abans de començar el re-adobament s'ha de neutralitzar la pell adobada al crom per possibilitar als recurtents i als colorants una penetració regular en el cuir i evitar sobrecarregar la flor (Taula 7.14).

Rentat	
300% H ₂ O (T ^a 30°C)	Rodar 15'
Escórrer - buidar	
Neutralització	
100% H ₂ O (a T ^a 25°C)	
1% formiat de sodi	Rodar 10'
0.55% hidrogencarbonat de sodi	Rodar 4h
Comprovar pH (entre 4.8 - 5.1)	
Nit en repòs	
Comprovar pH (entre 4.8 - 5.1)	
0.10% hidrogencarbonat de sodi	Rodar 1h
Escórrer - buidar	
150% H ₂ O (a T ^a 40°C)	Rodar 10'
Escórrer - buidar	
Re-adobament	
100% H ₂ O (a T ^a 50°C)	
4.5% resina acrílica	Rodar 45'
Tintura	
1.25% dispersant	Rodar 10'
2.50% colorant universal - origen vegetal (dissolt 1:20)	Rodar 50'
0.60% formiat sòdic	Rodar 1h
Greixatge	
7.0% triglicèrid sulfatat	
1% oli de peix sulfitat (tot emulsionat amb H ₂ O a 50°C)	Rodar 60'
1% àcid fòrmic (dissolt 1:4)	Rodar 20'
Escórrer - buidar	
200% H ₂ O	Rodar 5'
Escórrer - buidar	
<i>Assecar les pells a 23°C i 50% HR, penjades amb pinces tensores</i>	

Taula 7.14. Fòrmula seguida des del rentat posterior a l'adobament fins a l'engreix (% sobre pes de pell rebaixada)

Les pells es deixen assecar durant 3 dies. Un cop seques, es treuen i es batanen en bombo.

A part del control de creixement microbiològic que s'estudia en les pells en estat wet blue, un cop tenyides i engreixades, se'ls realitzen diversos assajos per comprovar la qualitat del cuir.

L'adobament de les dues fulles es realitza a la planta pilot de l'Escola d'Enginyeria d'Igualada. Els estudis posteriors de control de creixement es duen a terme a la Unitat de Microbiologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, així com tots els assajos amb els fongs.

4.2. Control de creixement de fongs sobre la pell wet blue

La prova de creixement de fongs es realitza amb els fongs descrits a la Taula 7.11, i seguint la norma ASTM D4576-01 (veure Capítol 3, apartat 4.2.). El control es fa durant 90 dies. És important comprovar l'eficàcia dels fungicides en bombos a una escala molt superior a la que s'ha fet fins al moment.

4.3. Característiques organolèptiques de la pell

A partir de la observació i el tacte de la pell, es descriu l'aspecte de la pell tenyida i engreixada. S'observa el tacte, la fermesa, la duresa, el travessat de la tintura, la finor de flor i l'aspecte dels porus del cuir obtingut.

4.4. Tests físics

Les mostres de pell que estan sotmeses a aquest tipus de proves físiques han d'estar com a mínim durant 48h abans dels assajos en una atmosfera normalitzada, segons la norma IUP 3 (ISO 2419:2012). La norma recomana una temperatura ambiental de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ i una humitat relativa de $65\pm 5\%$ (20/65) o, altrament, una temperatura ambiental de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ i una humitat relativa de $50\pm 5\%$ (23/50). Aquestes darreres condicions són les utilitzades a Europa, i són, per tant, les escollides.

Primer de tot, es fa una valoració de la igualació de la tintura a la pell. Posteriorment, la Taula 7.15 mostra els diferents assajos físics que realitzats sobre el cuir. (Font 2002)

Test físic	Mètode	Norma Internacional	Norma Europea
Solidesa a la llum del color del cuir: llum diürna	IUF 401	ISO 105-B01:1994	EN ISO 105-B01
Solidesa del color del cuir a la gota d'aigua	IUF 420	ISO 15700:1998	EN ISO 15700
Solidesa al frec del color del cuir (sec i humit)	IUF 450	ISO 11640:2013	EN ISO 11640
Resistències			
- A l'esquinçament	IUP 8	ISO 3377-2:2002	EN ISO 3377-2
- A la tracció i del percentatge d'elongació	IUP 6	ISO 3376:2011	EN ISO 3376
- A la ruptura de flor	IUP 9	ISO 3379:1976	EN ISO 3379

Taula 7.15. Tests físics realitzats a la pell en crust (Font 2002)

És important destacar que les mostres de pell de les que es disposa estan en estat crust, sense acabar, i l'èxit dels assajos aquí aplicats s'exigeixen a cuirs als que se'ls hi ha aplicat un acabat final.

Els resultats obtinguts per les proves que s'expliquen a continuació seran orientatius per observar si els fungicides alternatius aplicats exerceixen algun tipus d'efecte negatiu al cuir.

4.4.1. Igualació de la tintura

Es determina la igualació de la tintura al cuir. Amb l'ajut d'un espectrofotòmetre DATACOLOR 400 (veure Capítol 3, apartat 3.6.) es comprova si existeixen diferències significatives en la igualació de la tintura aplicada a la pell, és a dir, si el color del cuir obtingut és uniforme al llarg de tota la mostra.

4.4.2. Solidesa a la llum del color del cuir: llum diürna

La solidesa és la capacitat del cuir per resistir les influències externes que tendeixen a modificar el color i l'aspecte de la seva superfície.

L'acció de la llum solar sobre el cuir provoca diferents fenòmens, el més notori és la decoloració produïda per la lenta descomposició dels colorants. Altres efectes poden ser coloracions, enfosquiment, engrogiment, en definitiva, envelliment. (Font 2002)

Per a realitzar aquest test, les dues pells es deixen durant 24h sotmeses a raigs UV, utilitzant el SUNTEST (veure Capítol 3, apartat 3.8.) junt amb l'escala de blaus. Aquesta escala de color

servirà per valorar el canvi de color patit pel cuir. (IUF 401, ISO 105-B01:1994). Passat aquest temps, la decoloració de la pell es compararà amb la decoloració de l'escala de blaus.

4.4.3. Solidesa del color del cuir a la gota d'aigua

Aquest assaig és un dels més importants per a confecció i marroquineria. Consisteix en determinar el temps necessari per a la penetració d'una gota d'aigua de 0.15mL dipositada sobre la superfície del cuir. Un cop la pell està seca, es valora l'aspecte de l'àrea a on s'havia dipositat la gota, examinant la possible formació d'una aureola, taca, variació de color, inflament o pèrdua de lluentor. (IUF 420, ISO 15700:1998)

4.4.4. Solidesa al frec del color del cuir (sec i humit)

La resistència al frec és una de les propietats més importants del cuir i una de les més difícils de satisfer en humit. Pràcticament tots els tipus de cuirs estan obligats a un determinat grau de resistència al frec.

La mostra de pell es fixa amb la cara a assajar cap amunt, sobre una plataforma horitzontal capaç de desenvolupar un moviment de vaivé amb un recorregut de 3.5cm i una freqüència de 40 cicles per minut. La mostra s'estira un 10% de la seva longitud en la mateixa direcció en que s'accionarà el moviment. El feltre, quadrat de llana, s'aplica sobre la superfície del cuir amb una càrrega ajustable (mínim de 500g fins a 1kg). (IUF 450, ISO 11640:2013). (Font 2002)

Generalment es realitzen dos assajos, un amb feltre sec i un altre amb feltre humit. El nombre de cicles a aplicar depèn de les exigències de l'article concret. En aquest cas, al tractar-se d'una pell sense acabat no es pot exigir una solidesa molt elevada; es realitzen 50 freqs en SEC i 20 freqs en HUMIT.

Es valora la pell i el feltre, aquest últim amb l'escala de grisos (escala de color normalitzada per valorar el canvi de color del feltre). (IUF 131, ISO 105-A02:1993) La nota 5 correspon a la màxima solidesa i la nota 1 a la més baixa.

4.4.5. Resistències

Abans de procedir amb els diferents assajos de resistències, es requereix la determinació del gruix de la pell. Aquesta mesura es realitza d'acord amb la norma IUP 4 (ISO 2589:2002), que

utilitza un calibrador micromètric de disc, muntat sobre una base ferma. La pressió aplicada és de 500g/cm².

4.4.5.1. Resistència a l'esquinçament

La resistència a l'esquinçament s'utilitza per avaluar la capacitat del cuir per aguantar les tensions multidireccionals a que es troba sotmès en els seus usos pràctics. Existeixen diferents mètodes per mesurar aquest tipus de resistència, i el que aquí es segueix és l'anomenat "Desgarro de doble filo", segons el mètode IUP 8 (ISO 3377-2:2002). Aquest mètode es basa en determinar la força necessària per esquinçar una proveta de pell, amb un orifici al centre. Un dinamòmetre, actuant a velocitat constant, és l'encarregat d'exercir la força necessària. (Font 2002)

$$\text{Resistència a l'esquinçament (IUP 8)} = \frac{F}{T}$$

Equació 7.1

F – Força màxima [N]

T – Gruix mig de la proveta [mm]

4.4.5.2. Resistència a la tracció o a l'allargament

Per determinar la resistència a la tracció es segueix la norma IUP 6 (ISO 3376:2011). El procediment és fixar un proveta de cuir allargada entre les pinces d'un dinamòmetre i procedir a separar aquestes pinces a una velocitat constant amb un força aplicada. La proveta es deforma, s'allarga, fins a produir-se el seu trencament.

$$\text{Resistència a la tracció} = \frac{F}{W \times T}$$

Equació 7.2

F – Força major [N]

W – Amplada mitjana de la proveta [mm]

T – gruix mig de la proveta [mm]

El percentatge d'elongació es calcula com la diferència entre la separació final i la separació inicial de la proveta.

$$\% \text{ d'elongació al trencament} = \left(\frac{L_2 - L_0}{L_0} \right) \times 100$$

Equació 7.3

L₂ – Separació de les pinces al trencament

L₀ – Separació inicial de les pinces

4.4.5.3. Resistència a la ruptura de flor

Per assajar l'aptitud de les pells que han de suportar una deformació de la seva superfície s'utilitza el mètode IUP 9 (ISO 3379:1996), basat en el lastòmetre. Un instrument que aguanta fermament una proveta de cuir en forma circular amb el costat flor enfora. Una bola d'acer exerceix una força a velocitat constant pel costat carn fins que esdevé una primera fissura a la flor. (Font 2002)

S'anota la força exercida per la bola (F) i la distensió (D), la distància en mm entre la posició inicial i l'actual.

F – Força [N]

D – Distensió [mm]

4.5. Determinació de fungicida a la pell

Un cop seca, una mostra de la pell obtinguda de cadascun dels dos processos, amb fungicides diferents, es divideix en 3 capes (Figura 7.1), utilitzant la màquina de dividir (veure Capítol 3, apartat 3.7.).

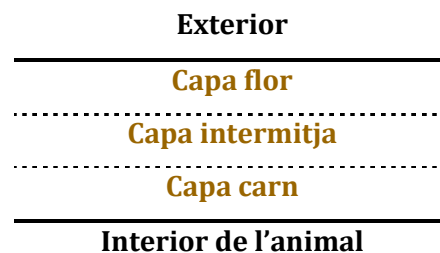


Figura 7.1 Esquema de la divisió de la pell en capes

En cada capa es determina el fungicida amb el mètode descrit a la norma; EN ISO 13365 (Font et al. 2011) (veure Capítol 3, apartat 4.3.). Aquests anàlisis es realitzen per la pell en crust i així es comprova com ha penetrat cadascun dels productes antifúngics.

5. Resultats

5.1. Procés d'adobament d'una pell vacuna en planta pilot

L'aspecte de les pells assecant-se, tensades amb les pinces, es pot observar a la Imatge 7.9. El color és més clar quan la pell és seca.



Imatge 7.9. Aspecte de les pells assecant-se, tensades

En la Imatge 7.9, les dues fotografies superiors mostren la pell sortida dels bombos, acabada d'estendre. Les dues fotografies inferiors mostren la pell seca, tres dies després.

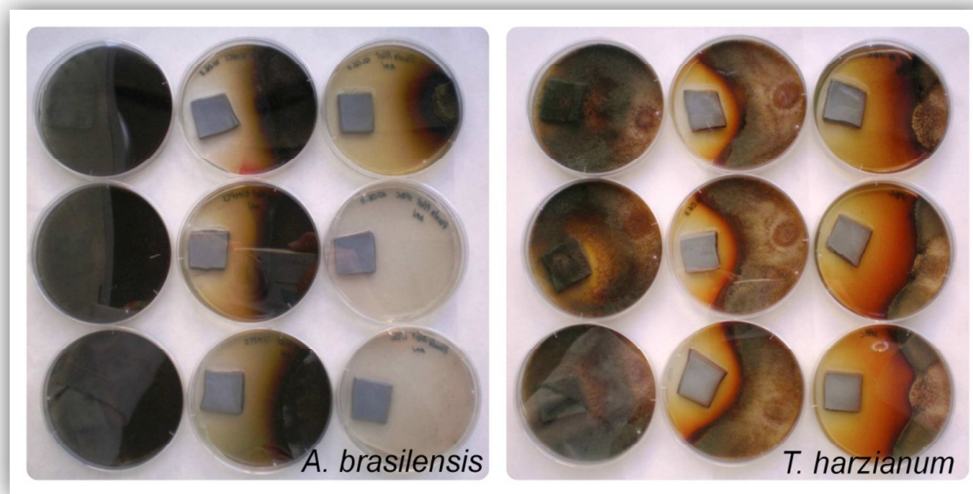
5.2. Control de creixement de fongs sobre la pell wet blue

Setmanalment es fa la lectura de resultats i s'anota el percentatge de pell atacada per fongs i la zona d'inhibició que crea el fungicida al seu voltant. Tots els resultats, la mitjana i la seva desviació estàndard s'inclouen en l'Annex D. La Taula 7.16 mostra la mitjana dels resultats obtinguts després de tres mesos de la sembra.

FUNGICIDA	<i>Aspergillus brasiliensis</i> CECT 2088		<i>Trichoderma harzianum</i> CECT 2423		<i>Penicillium spinulosum</i> QF01		<i>Penicillium decumbens</i> QF02		<i>Trichoderma harzianum</i> LL01	
	CS	ZI	CS	ZI	CS	ZI	CS	ZI	CS	ZI
CONTROL	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
DIMPTS	0	14	0	10	0	16	7	0	38	13
IPBC	0	41	0	26	0	27	0	26	0	26

Taula 7.16. Mitjana dels resultats de Creixement en Superfície CS (%) i de la Zona d'Inhibició - ZI (mm), després de 90 dies de control

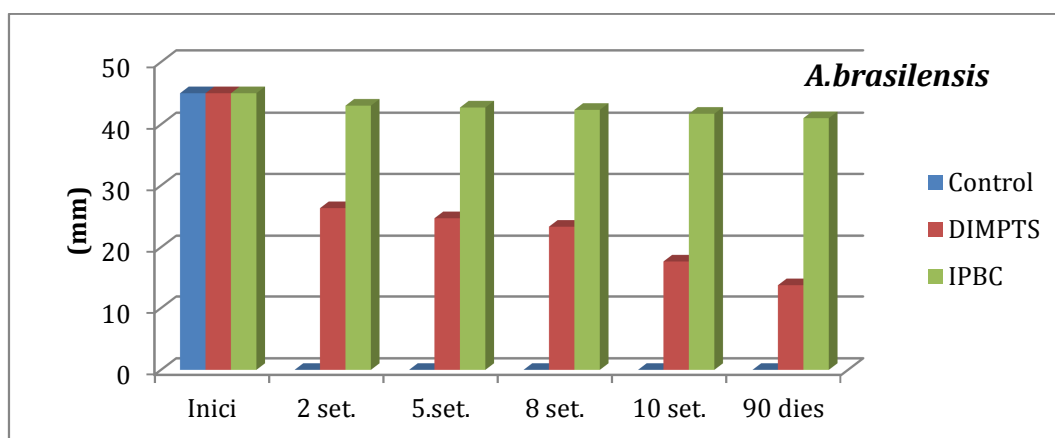
La Imatge 7.10 mostra les plaques després de 90 dies de creixement. Les fotografies corresponen al control davant les dues soques adquirides.



Imatge 7.10. Control de creixement de l'*Aspergillus brasilensis* (CECT 2088) i el *Trichoderma harzianum* (CECT 2423) després de 90 dies d'incubació. Columna d'esquerra a dreta; control, DIMPTS i IPBC

El fet d'aplicar qualsevol dels dos productes alternatius a la pell en la planta pilot resulta eficaç davant dues de les soques adquirides. La zona d'inhibició del IPBC és major que la del DIMPTS, inclús per evitar el creixement de l'*Aspergillus brasilensis* (CECT 2088) en l'agar de dues de les tres plaques.

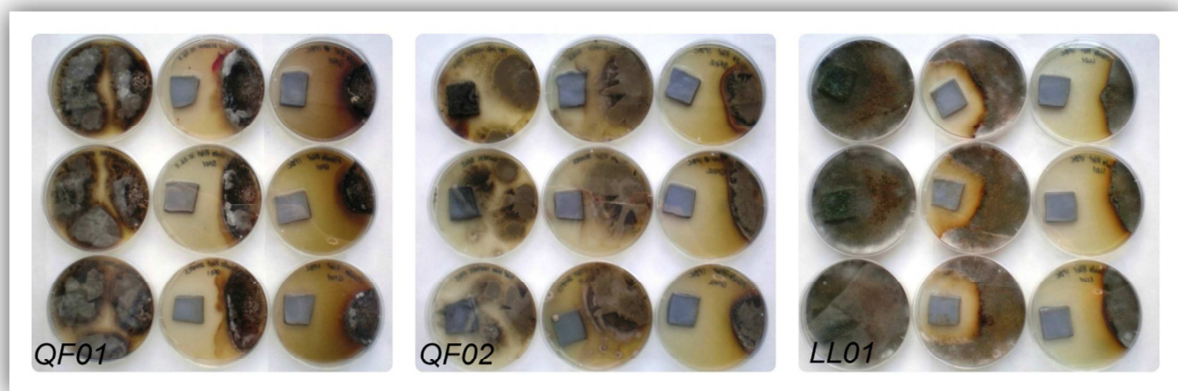
La Gràfica 7.2 mostra l'evolució de la zona d'inhibició (ZI) al llarg de les dotze setmanes, respecte l'*Aspergillus brasilensis* (CECT 2088). Mentre que la ZI del control desapareix abans de dues setmanes d'haver sembrat els fongs, la ZI del DIMPTS i del IPBC van disminuint però es mantenen, sent la del IPCB molt major que la zona d'inhibició del DIMPTS.



Gràfica 7.2. Evolució de la Zona d'Inhibició (ZI) del DIMPTS i del IPBC respecte l'*Aspergillus brasilensis* (CECT 2088)

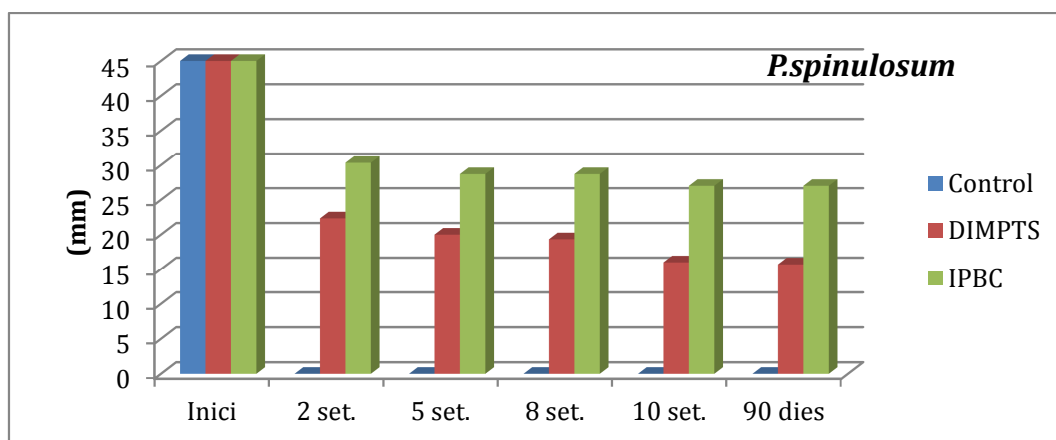
El control de creixement utilitzant les tres soques aïllades de fàbrica es mostra a la Imatge 7.11. Davant el *Penicillium spinulosum* (QF01) es segueix confirmant l'efectivitat dels dos productes. En canvi, el DIMPTS resulta ineficaç davant el *Penicillium decumbens* (QF02) i el *Trichoderma harzianum* (LL01), destacant que aquest últim ataca la pell a la vegada que el producte crea halo d'inhibició al voltant de la mostra, tot i que la pell queda contaminada, la protecció evita que els fongs envaeixin el 100% de les mostres.

Es remarca que l'atac del *Penicillium decumbens* (QF02) a les pells protegides amb DIMPTS va començar transcorreguts dos mesos de la sembra.



Imatge 7.11. Control de creixement del *Penicillium spinulosum* (QF01), *Penicillium decumbens* (QF02) i *Trichoderma harzianum* (LL01) després de 90 dies d'incubació. Columna d'esquerra a dreta; control, DIMPTS i IPBC

Un altre exemple de l'evolució de la zona d'inhibició durant els 90 dies del control es mostra a la Gràfica 7.3, en aquest cas amb la soca *Penicillium spinulosum* (QF01).



Gràfica 7.3. Evolució de la Zona d'Inhibició (ZI) del DIMPTS i del IPBC respecte el *Penicillium spinulosum* (QF01)

Com s'observa en pràcticament tots els casos de control de creixement, les mostres del control no produeixen cap mena de zona d'inhibició al seu voltant, i en menys de dues setmanes els fongs ja envaeixen totes les mostres sense fungicida.

5.3. Característiques organolèptiques de la pell

A simple vista s'aprecia un resultat molt satisfactori. Unes pells sense taques, amb una tintura uniforme, ferma i un bon tacte. Aquest és un dels principals objectius que es pretenia assolir amb aquesta prova; comprovar que el fet d'afegir un fungicida diferent a l'habitual, no afectés al resultat final. El travessat de la tintura ha estat ser correcte i la finor i els porus de la flor han presentat un aspecte adequat, sense cap mena de contrarietat.

5.4. Tests físics

5.4.1. Igualació de la tintura

Tant per a la pell amb DIMPTS com per a la pell amb IPBC, s'han mesurat tres paràmetres (lluminositat, saturació i to) de 10 localitzacions diferents de la pell, per comprovar la igualació de la tintura. Els resultats es mostren en les Figures 7.2 i 7.3. L'espectrofotòmetre DATACOLOR 400 (veure Capítol 3, apartat 3.6.) utilitzat mesura la mitjana i la desviació estàndard d'aquestes 10 mesures. (Taula 7.17)

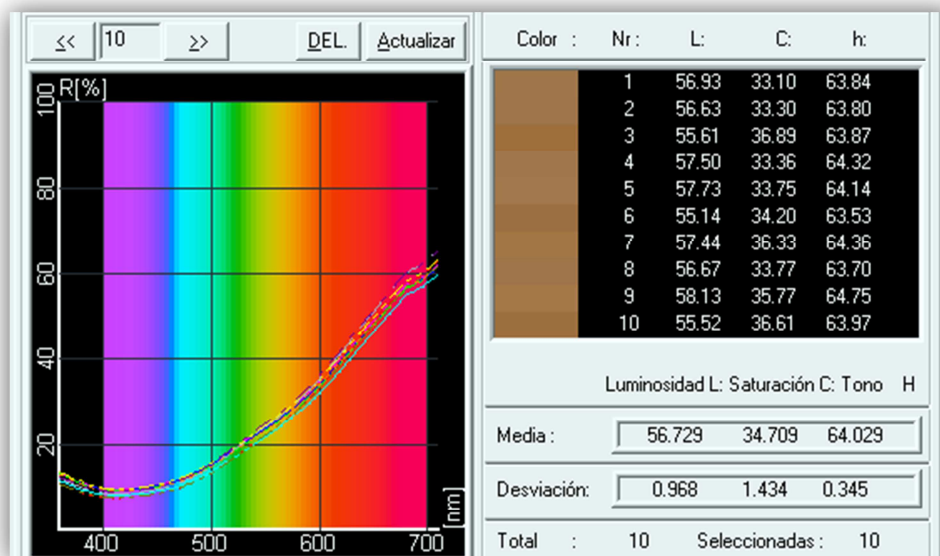


Figura 7.2. Resultats de la mesura de la igualació de color de la mostra amb DIMPTS

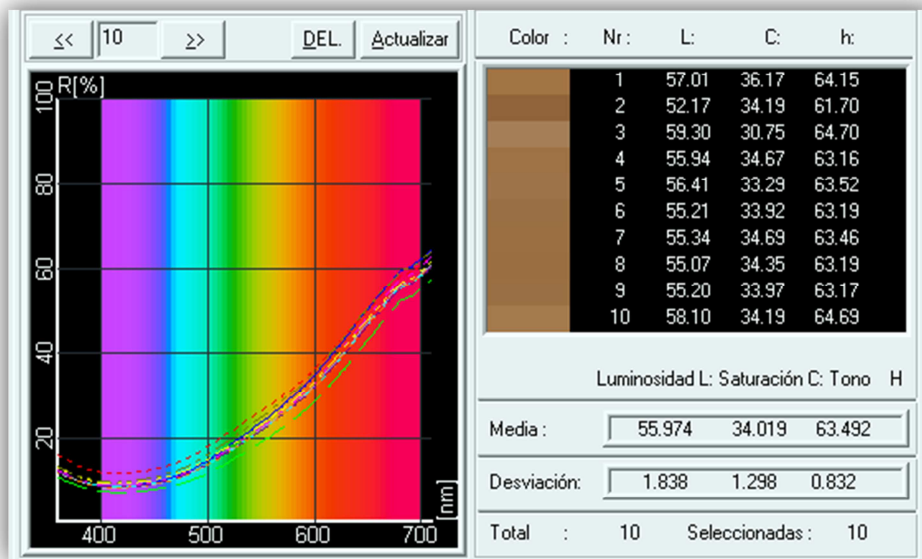


Figura 7.3. Resultats de la mesura de la igualació de color de la mostra amb IPBC

		<i>L Iluminositat</i>	<i>C saturació</i>	<i>H to</i>
DIMPTS	Mitjana	56.73	34.71	64.03
	Desviació estàndard	0.97	1.43	0.35
IPBC	Mitjana	55.97	34.02	63.49
	Desviació estàndard	1.84	1.30	0.83

Taula 7.17. Mitjana i desviació estàndard de les 10 mesures pel cuir amb DIMPTS i amb IPBC

En tots dos casos, es destaca la baixa desviació estàndard de l'absorbància dels tres paràmetres que mesura l'espectrofotòmetre. Comparant la mitjana dels tres paràmetres per les dues pells, s'observa que el color obtingut a les dues mostres de cuir és molt similar. Es pot afirmar que el fet d'aplicar tant el DIMPTS com el IPBC no afecten negativament a la igualació de la tintura al llarg de tota la mostra.

Padoan (2006) apuntava que un dels inconvenients que presentava el IPBC era que podia causar descoloriment, però aquest no ha estat el cas de les mostres aquí assajades.

5.4.2. Solidesa a la llum del color del cuir: llum diürna

Les dues pells es deixen durant 24h al SUNTEST (sota els efectes de la llum UV) (veure Capítol 3, apartat 3.8.) junt amb l'escala de blaus. Passat aquest temps, la decoloració de la pell es compara amb la decoloració de l'escala de blaus, i es qualifica amb una nota de 2 cadascuna de les pells.

No és un resultat molt satisfactori en aquest tipus de proves, però s'ha de tenir en compte que es tracta d'una pell en crust, sense acabat, i per tant, no es pot exigir un 3, valor mínim que exigeix la norma. (IUF 401, ISO 105-B01)

També s'ha de destacar que el colorant que s'ha utilitzat és d'origen vegetal, i aquest tipus de productes no suporten tant la llum. En canvi, es pot afirmar que no es produeixen taques ni cap mena problema en el cuir obtingut.

La pell original i la pell després d'estar 24h sota els efectes de la llum UV es compara utilitzant l'espectrofotòmetre DATACOLOR 400 (veure Capítol 3, apartat 3.6.). Els resultats d'aquesta comparació es mostren a la Figura 7.4.

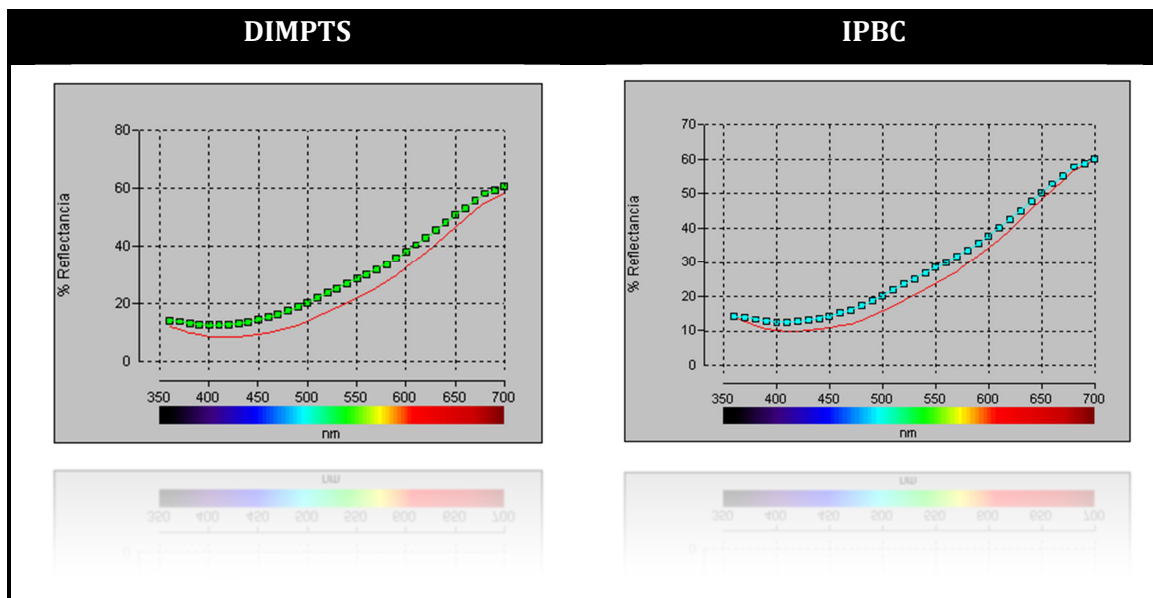


Figura 7.4. Gràfiques comparatives del color del cuir abans i després d'estar sotmesa a radiació UV

La reflectància mesura la quantitat de llum que reflexa una superfície. La línia vermella mostra el % de reflectància de la pell original i la línia de punts mostra el % reflectància de la pell després de 24h sota els efectes de la llum UV. La variació d'aquesta reflectància és similar en tots dos casos, i tot i tractar-se d'una pell sense acabat, aquesta variació és molt baixa respecte la mostra original.

5.4.3. Solidesa del color del cuir a la gota d'aigua

Al tractar-se de pells sense acabat, aquesta prova es fa principalment per comprovar la seva capacitat d'absorció, característica important a l'hora de fer-hi qualsevol tipus d'acabat.

Volum de la gota d'aigua desionitzada	0.150mL
Temps que triga la pell a absorbir la gota d'aigua	Pell amb DIMPTS → 14 segons Pell amb IPBC → 46 segons

En el cas del IPBC, la pell triga tres vegades més a absorbir la gota, i s'observa que, un cop seca, la zona de la gota queda marcada al cuir. Els 14 segons que triga la gota a mullar el cuir amb DIMTPTS no són suficients per a que aquesta deixi cap marca a la pell.

En qualsevol cas, els dos són valors molt baixos, i si es volgués que la pell tingués repel·lència a l'aigua s'hauria de dissenyar un readobament i un greixatge específics.

5.4.4. Solidesa del cuir al frec (sec i humit)

Un cop realitzats els 50 frecs en sec i els 20 en humit, s'observa que cap dels 4 feltres (2 per cada pell) s'han tintat. La pell queda una mica marcada de la zona a on s'han realitzat els frecs humits, però no han deixat anar color al feltre. La transferència de color al feltre es pot avaluar amb una nota de 5 (la màxima) en els dos casos, tant per frec sec com per frec humit.

5.4.5. Resistències

5.4.5.1. Resistència a l'esquinçament

Els resultats obtinguts de la resistència a l'esquinçament es mostren a la Taula 7.18.

		Mitjana GRUIX (mm)	FORÇA (N)	ESQUINÇAMENT (N/mm)	Mitjana i desv. estàndard ESQUINÇAMENT
DIMPTS	paral·lel	2.3	220.7	95.97	99.4 N/mm
	paral·lel	2.2	233.5	106.13	
	perpendicular	2.5	219.7	87.90	$\sigma = 9.2$
	perpendicular	2.0	214.8	107.42	
IPBC	paral·lel	3.4	177.6	52.22	53.6 N/mm
	paral·lel	4.4	171.7	39.02	
	perpendicular	3.9	214.8	55.09	$\sigma = 12$
	perpendicular	3.0	204.0	68.02	

Taula 7.18. Resultats de la resistència a l'esquinçament per la pell amb DIMPTS i per la pell amb IPBC

Diferents especificacions exigeixen una resistència a l'esquinçament $> 30 \text{ N/mm}$ (recomanació GERIC (Grouping of European Leather Technology Centres) per napa per confecció) o $\geq 50 \text{ N/mm}$ (UNE 59900:1999, per empenya de sabata sense folre). Les dues mostres compleixen amb les estipulacions descrites, però, tot i tractar-se de la mateixa pell presenten diferències de la resistència a la tracció. El gruix de la pell també és diferent en els dos casos, aquest factor pot afectar als resultats.

5.4.5.2. Resistència a la tracció o a l'allargament

La Taula 7.19 mostra els paràmetres de la determinació de la resistència a la tracció, les mesures realitzades i els resultats del càlcul final.

		Mitjana GRUIX (mm)	FORÇA (N)	TRACCIÓ (N/mm ²)	Mitjana i desv. estàndard
DIMPTS	paral·lel	2.6	912.3	35.09	43.4 N/mm
	paral·lel	1.9	829.0	43.63	
	perpendicular	3.0	917.2	30.57	$\sigma = 14.9$
	perpendicular	1.3	833.9	64.14	
IPBC	paral·lel	5.2	936.9	18.02	20.4 N/mm
	paral·lel	5.9	760.3	12.89	
	perpendicular	3.2	858.4	26.82	$\sigma = 6.2$
	perpendicular	3.4	814.2	23.95	

Taula 7.19. Resultats de la resistència a la tracció per la pell amb DIMPTS i per la pell amb IPBC

La resistència a la tracció s'ha calculat considerant els 10mm de l'amplada mitjana de la proveta. Aplicant la fórmula s'obté el resultat final.

Tot i que les recomanacions siguin diferents segons l'origen i el destí final del cuir, la pell obtinguda entraria dins les limitacions de diferents productes. Segons GERIC, es recomana una resistència a la tracció $>12 \text{ N/mm}^2$ per pell per confecció.

Es destaca que, igual com en els resultats de la resistència a l'esquinçament, el valor obtingut per la pell amb IPBC és menor (en aquest cas, la meitat) que els valor de resistència a la tracció del cuir amb IPBC. Per confirmar si aquests resultats són deguts a la diferència de fungicida, s'hauria de reproduir el mateix procés amb diferents pells.

La causa d'aquesta desviació de resultats pot ser deguda al diferent gruix de les mostres. El cuir és un material amb una estructura fibrosa irregular, que presenta diferències en compacitat i en la orientació i ordenació dels eixos de fibres. Per això, les seves propietats físiques, i en menys mesura les químiques, varien considerablement segons la part de la pell. Entre determinades zones de la falda i el crupó es donen diferències superiors de fins a un 200% en les resistències mecàniques i fins a un 300% en allargament. (Font 2002)

La Taula 7.20 inclou els resultats del percentatge d'elongació al trencament. Els resultats són pràcticament iguals per les dues mostres.

		L ₀ (mm)	Deformació (mm)	L ₂ (mm)	% elong.	Mitjana i desv. estàndard
DIMPTS	paral·lel	108.0	103.5	211.5	95.8	95.2 % $\sigma = 0.9972$
	paral·lel	95.0	91.3	186.3	96.1	
	perpendicular	69.0	64.8	133.8	93.9	
	perpendicular	78.0	74.0	152.0	94.9	
IPBC	paral·lel	96.0	91.3	187.3	95.1	95.0 % $\sigma = 0.3961$
	paral·lel	83.0	79.2	162.2	95.4	
	perpendicular	103.0	97.8	200.8	95.0	
	perpendicular	85.0	80.3	165.3	94.5	

Taula 7.20. Resultats del % d'elongació per la pell amb DIMPTS i per la pell amb IPBC

5.4.5.3. Resistència a la ruptura de flor

Aquest és un paràmetre més exigent en cuirs amb algun tipus d'acabat, tot i així, s'ha inclòs en els tests físics a analitzar. El test s'ha realitzat per dues provetes de cada cuir. No hi ha càlculs, només l'anotació dels valors obtinguts i aquests es mostren a la Taula 7.21.

	Mitjana GRUIX (mm)	FORÇA (N)	DISTENCIÓ (mm)
DIMPTS	2.5	529.7	21.95
	2.3	537.6	17.80
IPBC	3.1	472.8	14.36
	3.9	667.1	15.98

Taula 7.21. Resultats de la ruptura de flor per la pell amb DIMPTS i per la pell amb IPBC

Les directrius per empenya de sabata especifiquen un mínim de 7mm de distensió, encara que es recomana superar els 8mm (especialment en cuir vacú) (Font 2002). En els dos casos es supera aquesta recomanació, i amb diferència.

5.5. Determinació de fungicida a la pell

En la Imatge 7.12 es pot veure clarament la divisió de les tres capes de la mostra de pell, en aquest cas, amb IPBC. Aquesta secció també va ajudar a comprovar la penetració de la tintura a la pell.



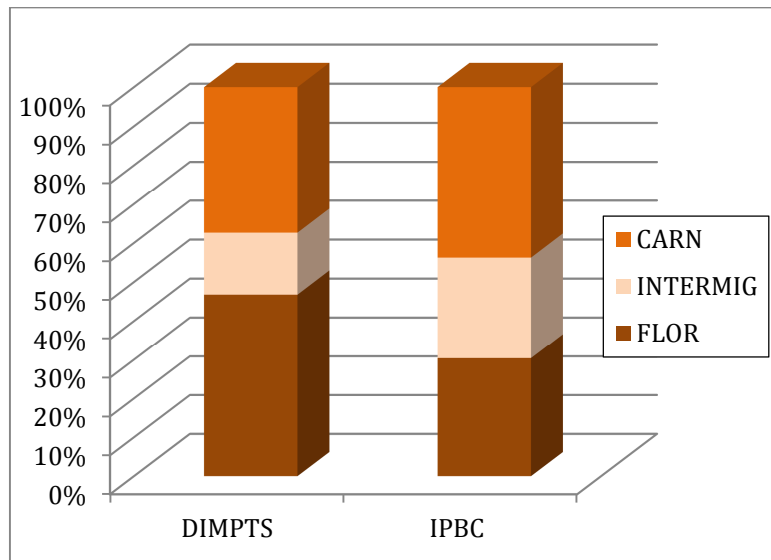
Imatge 7.12. Divisió en tres capes de la mostra de pell amb IPBC

La distribució estratigràfica dels fungicides determinats a la pell es mostra a la Taula 7.22. Tant pel DIMPTS com pel IPBC, la major quantitat de fungicida roman a les capes exteriors del cuir.

<i>Percentatge total de fungicida determinat (%)</i>		
Pell planta pilot	DIMPTS	IPBC
Capa Flor	46.8	30.4
Capa Intermitja	15.9	25.8
Capa Carn	37.4	43.8

Taula 7.22. Distribució de fungicida a les diferents capes de pell adobada en planta pilot

Els resultats es poden expressar com a la Gràfica 7.4. La capa intermitja és la que conté menor contingut de fungicida. És important que les capes externes quedin ben protegides per evitar l'entrada de possibles espores a l'interior de la pell.



Gràfica 7.4. Distribució estratigràfica dels fungicides al cuir

6. Conclusions

A primer cop d'ull, el fet d'utilitzar el DIMPTS i el IPBC, dos fungicides diferents als habituals en aquests tipus de processos, no afecta al resultat final. Afegir-los en un adobament al crom i continuar el procés fins a la tintura i l'engreix no afecta negativament al tacte ni a la fermesa del cuir obtingut.

Tot i tractar-se d'un procés a escala de planta pilot, un 0.2% de IPBC resulta efectiu enfront les cinc soques seleccionades per fer el control microbiològic. En canvi, l'aplicació de 0.2% de DIMPTS no és suficient per protegir la pell de dos dels cinc fongs estudiats.

El fet d'aplicar qualsevol dels dos fungicides alternatius no afecta negativament a la igualació de la tintura al llarg de tota la mostra. Si més no, amb colorant d'origen vegetal, com l'utilitzat en aquesta pràctica.

Davant els efectes de la llum UV, el canvi de color que es produeix al cuir és l'esperat d'una pell d'aquestes característiques, i és pràcticament el mateix en tots dos casos. En canvi, existeix una petita diferència entre la capacitat d'absorció de l'aigua de les mostres. Tot i que aquesta

capacitat sigui elevada en ambdós pells, la mostra tractada amb IPBC triga tres vegades més en absorbir la gota d'aigua, i això fa que quedi la marca a la superfície. En canvi, una nota màxima de 5 en la prova del frec (sec i humit) per les dues mostres confirma la bona fixació del color al cuir.

Es destaca que els resultats obtinguts de resistència a l'esquinçament i a la tracció per la pell a la que se li va afegir DIMPTS són pràcticament el doble que per la pell amb IPBC. La diferència de gruix entre les mostres és un factor important. Tot i així, segons els valors assolits, els cuirs obtinguts poden ser aptes per diferents articles finals, ja que entren dins de diferents recomanacions establertes en el sector. Aquesta diferència s'observa sovint en pells d'un mateix lot processades conjuntament. En principi no s'atribueix per tant a l'efecte del fungicida, tot i que s'hauria de confirmar en estudis a una escala més gran amb pells de diferent origen. La distensió de la ruptura de flor també supera sense problemes el mínim exigít per cuir vacú, destinat a empenya de sabata.

Una distribució estratigràfica amb major contingut de fungicida a les capes externes de la pell asseguren la protecció del cuir davant l'atac de diferents microorganismes. Tant en el cas del DIMPTS com del IPBC, la menor quantitat de fungicida (entre un 15 i un 25%) es troba en la capa intermitja de la pell, repartint-se la resta de producte a les capes externes, penetrant més cap a l'interior el IPBC que el DIMPTS.

CAPÍTOL 8

APLICACIÓ DE FUNGICIDES EN PÍQUEL DE CONSERVACIÓ

1. Introducció

Per ampliar el ventall d'aplicacions dels fungicides alternatius escollits, es va estudiar el seu efecte en un píquel de conservació. Les pells a les que se'ls aplica un píquel d'aquestes característiques poden estar setmanes o inclús mesos emmagatzemades, per tant, és important protegir-les de possibles atacs fúngics. Tot i que el pH no és l'idoni pel creixement d'aquest tipus de microorganismes, la temperatura i la humitat de l'ambient, així com els nutrients de la pell, fan que els fongs que habiten en l'entorn hi puguin créixer.

2. Objectius

L'objectiu principal és avaluar la capacitat fungicida del DIMPTS i del IPBC en un píquel de conservació, davant diferents soques de fongs. La capacitat fungicida d'aquests compostos en aquest tipus de procés es compararà amb la del TCMTB.

En aquest capítol s'aplicaran els fungicides escollits a un píquel de conservació d'una pell vacuna, en bombos de laboratori. Els anàlisis posteriors consistiran en realitzar un control microbiològic d'inoculació de la pell utilitzant diferents soques de fongs.

Una segona part d'aquest capítol serà aplicar diferents quantitats de dos dels fungicides proposats (DIMPTS i IPBC) en un píquel de conservació per determinar quina és la quantitat mínima necessària efectiva per conferir la protecció adequada a la pell davant els diferents fongs utilitzats.

Per últim, es realitzarà un píquel de conservació amb diferents fungicides seleccionats, i la pell resultant s'emmagatzemarà simulant les condicions reals de fàbrica. Tres mesos després, es continuarà amb el procés d'adobament. Es podrà comprovar si els fungicides són efectius, i es determinarà la quantitat de cada producte a la pell, abans i després de l'emmagatzematge.

3. Material i reactius

La Taula 8.1 mostra els fungicides utilitzats en l'estudi de la protecció en un píquel de conservació.

FUNGICIDA	NOM	% PRINCIPI ACTIU
TCMTB	2-(tiocianometiltio)-1,3-benzotiazol	30%
DIMPTS	Diiodometil-p-tolilsulfona	40%
IPBC	3-iodo-2-propinil-N-butilcarbammat	40%

Taula 8.1. Fungicides utilitzats en l'estudi del píquel de conservació

L'acció fungicida dels dos compostos alternatius seleccionats s'ha comparat amb l'eficàcia del TCMTB.

Els fongs (tant adquirits com aïllats) escollits pel control de creixement s'indiquen en la Taula 8.2.

MICROORGANISME	nº COL·LECCIÓ
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	CECT 2088
<i>Trichoderma harzianum</i>	CECT 2423
<i>Penicillium spinulosum</i> (QF01)	Soques aïllades
<i>Penicillium decumbens</i> (QF02)	(veure Capítol 4)
<i>Trichoderma harzianum</i> (LL01)	

Taula 8.2. Nom i número de col·lecció dels fongs utilitzats

Com s'ha fet fins ara, es treballa amb suspensió de l'ordre de 10^5 espores/mL, amb solució Ringer (veure Capítol 3, apartat 4.1.).

Totes les pells que s'han utilitzat són pells vacunes, de 32kg+, procedents de França. Per fer les proves, les pells van arribar amb un semi-píquel realitzat a fàbrica (Taula 8.3) i dividides en tripa a 3.3mm.

Semi - píquel	
4 % clorur de sodi	Rodar 20min
1.0 % àcid sulfúric	Rodar 1.5h i intermitent

Taula 8.3. Primera part de píquel, realitzada a fàbrica (% sobre pell tripa)

Abans de realitzar qualsevol prova, s'ha seguit el procés habitual de comprovar que la pell no contenia productes antifúngics residuals de processos anteriors, utilitzant el mètode d'extracció de la pell amb acetonitril i la posterior determinació utilitzant l'HPLC (veure Capítol 3, apartat 4.3).

4. Part experimental

4.1. Efectivitat dels fungicides alternatius en un píquel de conservació

Es parteix una pell en tres parts iguals per afegir tres fungicides diferents (Taula 8.1), reservant prèviament una mostra per realitzar-hi el mateix procediment però sense fungicida (control).

Per a cada mostra, s'efectua un píquel de conservació (Taula 8.4) en els bombos de laboratori (veure Capítol 3, apartat 4.3.), afegint els diferents fungicides.

Píquel de conservació	
4.0% clorur de sodi	Rodar 20'
1.0% àcid sulfúric	Rodar 90'
Escórrer – buidar	
1.0% clorur de sodi	
0.25% àcid sulfúric	
0.11% fungicida	Rodar 3h

Taula 8.4. Fórmula de píquel de conservació (% sobre pes de pell semi-piquelada)

De les pells piquelades es reserva:

Mostra de pell humida	Una mostra de pell piquelada humida per realitzar-hi el control de creixement de fongs. Conservada a 4°C.
------------------------------	---

4.1.1. Control de creixement de fongs sobre la pell piquelada

De les mostres de pell piquelades conservades humides, es realitza un control de creixement de fongs per a cadascuna de les cinc soques de la Taula 8.2. Com en tots els casos, s'efectua l'estudi per triplicat sobre plaques estèrils amb medi de cultiu agar de patata, seguint la norma ASTM D4576-01 (veure Capítol 3, apartat 4.2.).

S'emmagatzemen les plaques a 26°C, a la càmera climatitzada (veure Capítol 3, apartat 3.9.), en atmosfera humida i la lectura de resultats es realitza setmanalment, comparant amb el control, durant 90 dies.

4.2. Aplicació de diferents quantitats de fungicida

Es fracciona una pell en nou parts iguals. S'aplica un píquel de conservació a cada mostra en un bombo diferent segons la fórmula de la Taula 8.5. El que varia en cada cas és el tipus i la quantitat de fungicida afegit.

Píquel de conservació	
2 % clorur de sodi	
0.25% àcid sulfúric	
X % fungicida	Rodar 3h i intermitent
Nit en repòs	
Comprovar pH	Rodar 2'
Escórrer - buidar	

Taula 8.5. Fórmula del píquel de conservació (% sobre pes de pell semi-piquelada)

Prèviament es reserva una mostra per realitzar un píquel de conservació sense afegir-hi fungicida (control). Com en el cas de la pell wet blue (veure Capítol 7(I), apartat 4.2), a les vuit mostres restants se'ls afegeixen quatre quantitats diferents (C1 – C4) dels dos compostos fungicides seleccionats (DIMPTS i IPBC). Les diferents quantitats de fungicida addicionat (X) es mostren a la Taula 8.6.

Mostra	Fungicida	Mostra	Fungicida	% fungicida
M1	C1 - DIMPTS	M5	C1 - IPBC	0.04
M2	C2 - DIMPTS	M6	C2 - IPBC	0.08
M3	C3 - DIMPTS	M7	C3 - IPBC	0.12
M4	C4 - DIMPTS	M8	C4 - IPBC	0.16

Taula 8.6. Diferents quantitats de fungicida afegit en el píquel de conservació

De cada exemplar piquelat es guarda:

Mostra de pell humida	Una mostra de pell piquelada humida per realitzar-hi el control de creixement de fongs. Conservada a 4°C.
------------------------------	---

També es determina el contingut total de fungicida a la pell, d'una mostra de cada pell reservada seca, seguint la norma EN ISO 13365 (veure Capítol 3, apartat 4.3). Els resultats s'inclouen en l'Annex E.

4.2.1. Control de creixement de fongs sobre la pell piquelada

De les mostres de pell piquelada humides, es realitza un control de creixement de fongs per tres de les cinc soques escollides inicialment (Taula 8.7). Com en tots els casos, es segueix el procediment descrit a la norma ASTM D4576-01 (veure Capítol 3, apartat 4.2.).

MICROORGANISME	nº COL·LECCIÓ
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	CECT 2088
<i>Trichoderma harzianum</i>	CECT 2423
<i>Penicillium spinulosum</i> (QF01)	(veure Capítol 4)

Taula 8.7. Nom i número de col·lecció dels fongs utilitzats en aquest apartat

Les plaques romanen durant 90 dies emmagatzemades, a 26°C, en atmosfera humida. La lectura de resultats es fa cada setmana.

4.3. Píquel de conservació i emmagatzematge de les pells durant 3 mesos

4.3.1. Primera part del procés

Es retalla una pell en quatre parts iguals; tres d'elles per a realitzar un píquel de conservació amb tres fungicides diferents (TCMTB, DIMPTS i IPBC) i una part per realitzar el mateix píquel però sense afegir antifúngic. (Taula 8.8)

Píquel de conservació	
2 % clorur de sodi	
0.25 % àcid sulfúric	
0.15% fungicida	Rodar 3h i intermitent
Nit en repòs	
Comprovar pH	Rodar 2'
Escórrer - buidar	

Taula 8.8. Recepta del píquel de conservació aplicat per emmagatzemar les pells (% sobre pes de pell semi-piquelada)

De cada bombo es reserva:

Mostra de pell humida	Una mostra de pell piquelada humida, que es guarda dins de bosses de plàstic, apilades, simulant les condicions d'emmagatzematge a fàbrica. Aquestes mostres es conserven durant tres mesos a temperatura ambient.
Mostra de pell seca	Una mostra de pell seca per determinar-hi el contingut total de fungicida. Conservada a temperatura ambient.
Banys residuals de procés	Els banys residuals per determinar la toxicitat provocada pels diferents fungicides. (<i>Procediment i resultats en el Capítol 11</i>)

4.3.2. Segona part del procés

Després de tres mesos d'emmagatzematge, es treuen les pells humides de les bosses de plàstic i s'observa l'estat de les mostres. Es pesen i es continua amb el procés d'adobament. (Taula 8.9)

Adobament al crom	
60% H ₂ O	
4% clorur de sodi	Rodar 10'
4% sal de crom 33% basicitat	Rodar 2h
4% sal de crom 33% basicitat	Rodar 3h
1% formiat de sodi	Rodar 3h
Nit en repòs	
Comprovar pH (entre 2,8 – 3)	
1% bicarbonat de sodi	Rodar 1.5h
Comprovar pH (entre 3,5 – 4)	
0.1% fungicida	Rodar 60'
Escórrer - buidar	
100% H ₂ O	Rodar 5'
Escórrer - buidar	
Deixar les pells en cavallet	12h

Taula 8.9. Adobament del crom de les pells piquelades, emmagatzemades durant 3 mesos. (% sobre pes de pell piquelada)

Un cop adobades, es pesen les pells i s'utilitza aquest pes per calcular els productes a afegir seguint amb el procediment descrit a la Taula 8.10.

Rentat	
300% H ₂ O (T ^a 30°C)	Rodar 15'
Escórrer – buidar	
Neutralització	
100% H ₂ O (a T ^a 25°C)	
1% formiat de sodi	Rodar 10'
0.50% hidrogencarbonat de sodi	Rodar 3h
Comprovar pH (entre 4.8 – 5.1)	
Nit en repòs	
Comprovar pH (entre 4.8 – 5.1)	
Escórrer – buidar	
150% H ₂ O (a T ^a 40°C)	Rodar 10'
Escórrer – buidar	
Readobament	
100% H ₂ O (a T ^a 50°C)	
4.5% resina acrílica	Rodar 45'
Tintura	
1.25% dispersant	Rodar 10'
2.50% colorant universal (dissolt 1:20)	Rodar 50'
0.60% formiat sòdic	Rodar 1h
Greixatge	
7.0% triglicèrid sulfatat	
1% oli de peix sulfitat (tot emulsionat amb H ₂ O a 50°C)	Rodar 60'
1% àcid fòrmic (dissolt 1:4)	Rodar 20'
Escórrer – buidar	
200% H ₂ O	Rodar 5'
Escórrer – buidar	
<i>Assecar les pells a 23°C i 50% HR</i>	

Taula 8.10. De la neutralització a l'engreix (% sobre pes de pell adobada al crom)

De les pells seques es determina el contingut total de fungicida.

4.3.3. Contingut total de fungicida a la pell

Es realitza la determinació del contingut total de fungicida de la pell en tres punts del procediment:

- (1) Després de realitzar el píquel de conservació, abans d'emmagatzemar.
- (2) Transcorreguts tres mesos de l'emmagatzematge, just abans de seguir amb l'adobament
- (3) Al final del procés, després de la tintura i el greixatge.

En els tres casos, les mostres de pell s'assequen a temperatura ambient i es realitzen els assajos seguint la norma EN ISO 13365 (veure Capítol 3, apartat 4.3).

5. Resultats

5.1. Efectivitat dels fungicides alternatius en un píquel de conservació

5.1.1. Control de creixement de fongs sobre la pell piquelada

En un píquel de conservació segueixen produint millor resposta els fungicides DIMPTS i IPBC respecte el TCMTB. Encara que la quantitat de fungicida afegit no és suficient per evitar la contaminació de les mostres als 90 dies d'incubació, sí que ho és, en el cas dels fungicides alternatius, per impedir que la superfície de les pells tractades quedi totalment recoberta per fongs. A la Taula 8.11 es pot apreciar que els resultats obtinguts amb la mostra sense fungicida (control) i els obtinguts amb el TCMTB són exactament iguals. Tots els resultats, junt amb la mitjana i la desviació estàndard s'inclouen en l'Annex D.

FUNGICIDA	<i>Aspergillus brasiliensis</i> CECT 2088		<i>Trichoderma harzianum</i> CECT 2423		<i>Penicillium spinulosum</i> QF01		<i>Penicillium decumbens</i> QF02		<i>Trichoderma harzianum</i> LL01	
	CS	ZI	CS	ZI	CS	ZI	CS	ZI	CS	ZI
CONTROL	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
TCMTB	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
DIMPTS	6	0	33	1	35	0	57	0	2	4
IPBC	5	1	95	0	90	0	90	0	0	7

Tabla 8.11. Resultats de Creixement en Superfície (CS) i de Zona d'Inhibició (ZI) observats en les diferents mostres de pell piquelada, després de 90 dies de control.

Tot i que el rang de quantitats de fungicida que s'han afegit en els processos no ha estat suficient per evitar el creixement de fongs sobre pràcticament totes les mostres, en les imatges que

s'adjunten a continuació s'observa clarament major protecció a les pells que contenen DIMPTS i IPBC.

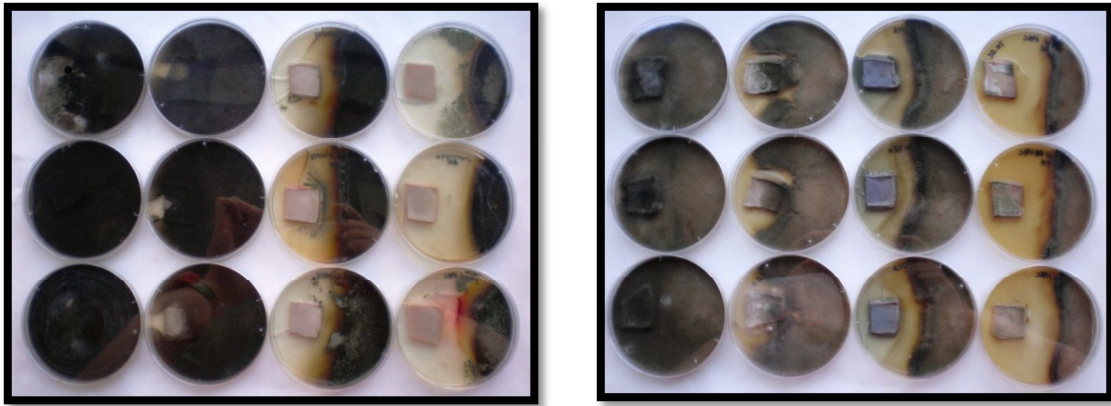
En un estudi previ, Bayramoglu (2006) confirmava que el TCMTB aplicat en el píquel (amb una oferta menor que la que aquí s'aplica, un 0.04%) no protegia les pells de l'*Aspergillus Brasilensis* o el *Trichoderma harzianum* més de dues setmanes. Els resultats mostren que tot i afegir més del doble, el TCMTB segueix sent ineficaç davant els fongs descrits.

La Imatge 8.1 és un exemple del control del creixement al llarg de les setmanes de la soca *Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088) sobre la placa i la pell piquelada. Es pot veure com poc a poc va creixent el fong, sent el control i les mostres amb TCMTB, les que en tres setmanes ja estan envaïdes.



Imatge 8.1. Control de creixement de l'*Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088) sobre la pell piquelada. En cada imatge, cada columna correspon a un fungicida diferent, d'esquerra a dreta; control, TCMTB, DIMPTS i IPBC

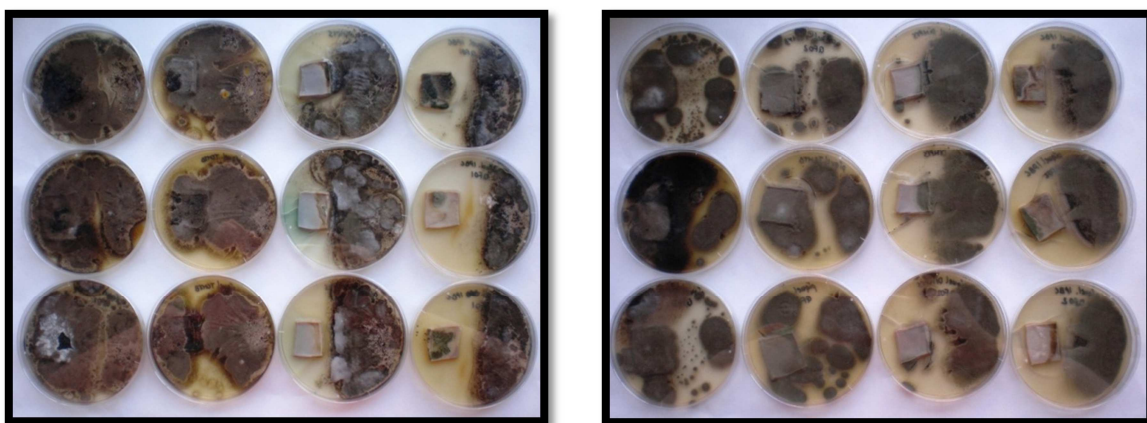
La soca de l'*Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088) i del *Trichoderma harzianum* (CECT 2423) cobreixen tota la superfície de la pell de les mostres control i de les mostres amb TCMTB. Les pells amb DIMPTS i IPBC creen un halo d'inhibició al seu voltant ben diferenciat (Imatge 8.2 i 8.3).



Imatge 8.2 i 8.3. Control de creixement de l'*Aspergillus brasilensis* (CECT 2088) (esquerra) i el *Trichoderma harzianum* (CECT 2423) (dreta) sobre pell piquelada, després de tres mesos d'incubació. Cada columna correspon a un fungicida diferent, d'esquerra a dreta; control, TCMTB, DIMPTS i IPBC

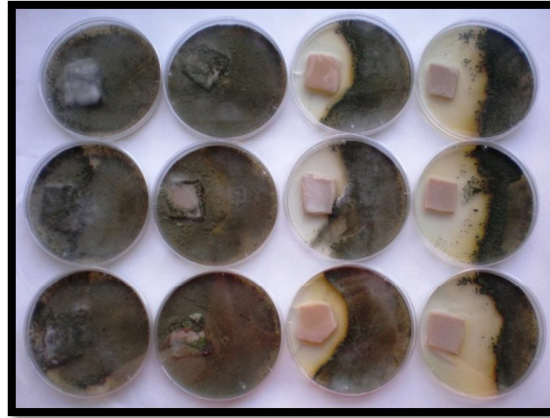
Bayramoglu et al. (2006), treballant en diferents experiments amb el *Trichoderma harzianum*, van detectar que la utilització de TCMTB no era prou efectiva davant d'aquesta soca. Tant les pells piquelades com les pells wet blue que contenien aquest tipus de fungicida quedaven recobertes per aquest fong en períodes de temps molt curts.

La protecció de les pells enfront les dues classes de *Penicillium sp.* és menys efectiva per tots els casos. Així com el control, les mostres amb TCMTB queden completament contaminades. Les pells amb els fungicides alternatius presenten una resistència major, però no suficient contra aquestes soques, si més no, a la concentració assajada (Imatges 8.4 i 8.5).



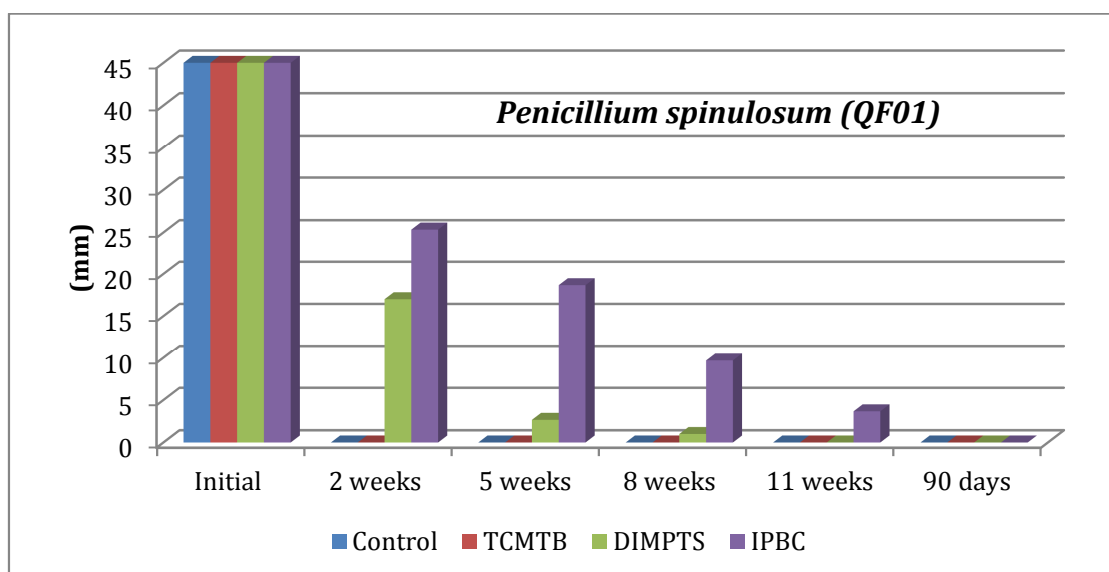
Imatge 8.4 i 8.5. Control de creixement del *Penicillium spinulosum* (QF01) (esquerra) i el *Penicillium decumbens* (QF02) (dreta) sobre pell piquelada, després de tres mesos d'incubació. Cada columna correspon a un fungicida diferent, d'esquerra a dreta; control, TCMTB, DIMPTS i IPBC

El dos fungicides alternatius (DIMPTS i IPBC) aconseguixen protegir pràcticament al 100% les pells de l'atac del *Trichoderma harzianum* (LL01). L'efectivitat del TCMTB davant aquesta soca és nul·la (Imatge 8.6).



Imatge 8.6. Control de creixement del *Trichoderma harzianum* (LL01) sobre pell piquelada, després de tres mesos d'incubació. Cada columna correspon a un fungicida diferent, d'esquerra a dreta; control, TCMTB, DIMPTS i IPBC

La Gràfica 8.1 és un exemple de l'evolució de la zona d'inhibició, en aquest cas davant la soca *Penicillium spinulosum* (QF01). A les dues setmanes ja s'observa clarament una millor resposta dels fungicides alternatius comparant amb el TCMTB. Amb una quantitat lleugerament major de fungicida possiblement es podria fer front al 90 dies de protecció amb el DIMPTS i el IPBC per totes les soques.



Gràfica 8.1. Evolució de la Zona d'Inhibició del *Penicillium spinulosum* (QF01) durant els 90 dies

Diversos autors (Binnur 1997, Bayramoglu 2006) confirmen que, davant l'atac de fongs, les pells adobades al crom són més resistents que les pells piquelades.

5.2. Aplicació de diferents quantitats de fungicida

5.2.1. Control de creixement de fongs sobre la pell piquelada

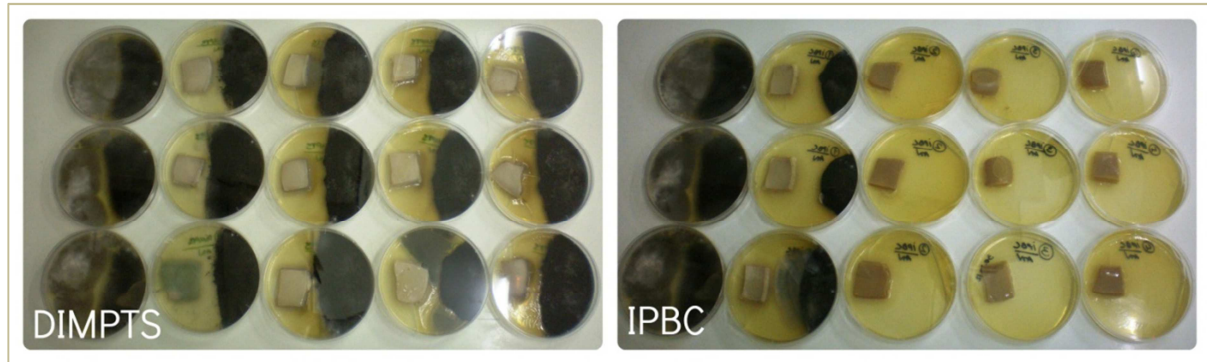
A la Taula 8.12 s'avaluen els resultats obtinguts del control de creixement aplicant diferents quantitats de DIMPTS i de IPBC a un píquel de conservació. La mitjana, la desviació estàndard i tots els resultats obtinguts estan inclosos en l'Annex D.

Píquel de conservació		<i>Aspergillus brasilensis</i> CECT 2088		<i>Trichoderma harzianum</i> CECT 2423		<i>Penicillium spinulosum</i> QF01	
DIMPTS		CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)
C0	Control	100	0	100	0	100	0
C1	0.04	33	0	100	0	99	0
C2	0.08	2	6	100	0	11	0
C3	0.12	1	7	20	0	9	0
C4	0.16	0	12	25	0	7	0
IPBC		CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)
C0	Control	100	0	100	0	100	0
C1	0.04	0	15	100	0	93	0
C2	0.08	0	45	78	0	13	1
C3	0.12	0	45	11	0	0	19
C4	0.16	0	45	30	15	0	6

Taula 8.12. Resultats de Creixement en Superfície (CS) i de Zona d'Inhibició (ZI) observats en les diferents mostres de pell piquelada, transcorreguts 90 dies de control

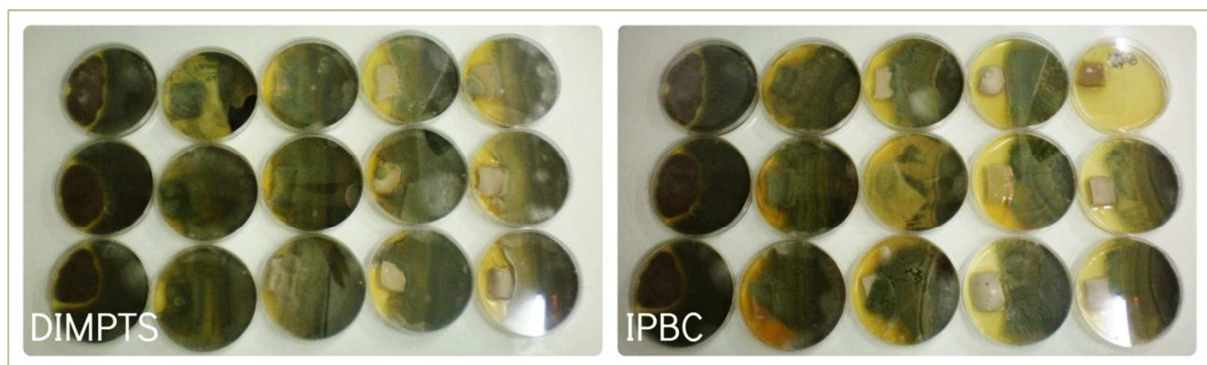
En el cas del DIMPTS, aquestes quantitats només són suficients per prevenir l'atac de l'*Aspergillus brasilensis* (CECT 2088), amb la major concentració aplicada. Per les altres dues soques es necessita una quantitat superior a un 0.16% de producte. En el cas del IPBC, la mínima concentració aplicada (un 0.04%) protegeix la pell de l'*Aspergillus brasilensis*, però es necessita un mínim d'un 0.12% per evitar la invasió del *Penicillium spinulosum* (QF01). En el cas del *Trichoderma harzianum* (CECT 2423), la quantitat que evita la contaminació de la pell ha de ser major que un 0.16%.

La protecció que exerceix el IPBC enfront l'*Aspergillus brasilensis* (CECT 2088) és tan elevada que inclús evita el creixement del fong sobre l'agar, en pràcticament totes les plaques (Imatge 8.7).



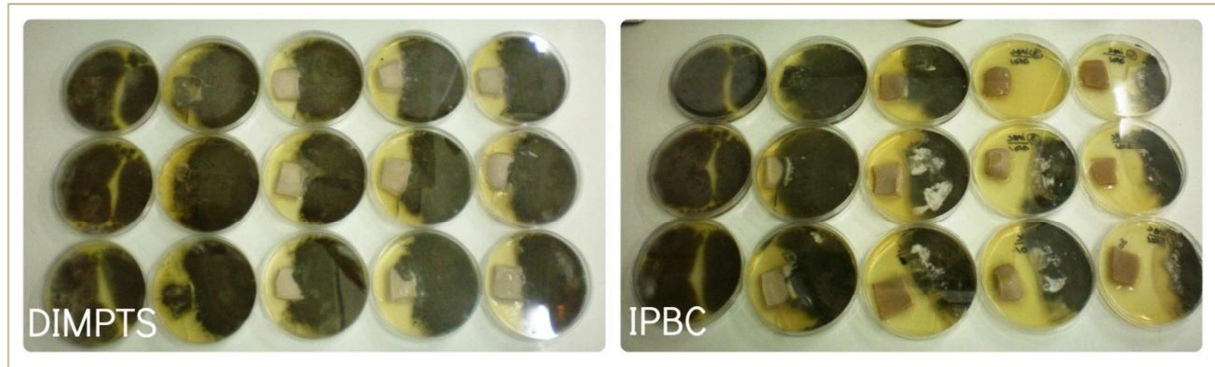
Imatge 8.7. Creixement de l'*Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088) amb diferents concentracions de DIMPTS i IPBC sobre pell piquelada. En cada cas, columna d'esquerra a dreta: control, 0.04%, 0.08%, 0.12%, 0.16% de fungicida

Ni la concentració més alta de fungicida afegida (un 0.16%) és suficient per evitar l'atac del *Trichoderma harzianum* (CECT 2423). A la Imatge 8.8, però, és veu com una concentració cada cop major millora la protecció de la pell.



Imatge 8.8. Creixement del *Trichoderma harzianum* (CECT 2423) amb diferents concentracions de DIMPTS i IPBC, sobre pell piquelada. En cada cas, columna d'esquerra a dreta: control, 0.04%, 0.08%, 0.12%, 0.16% de fungicida

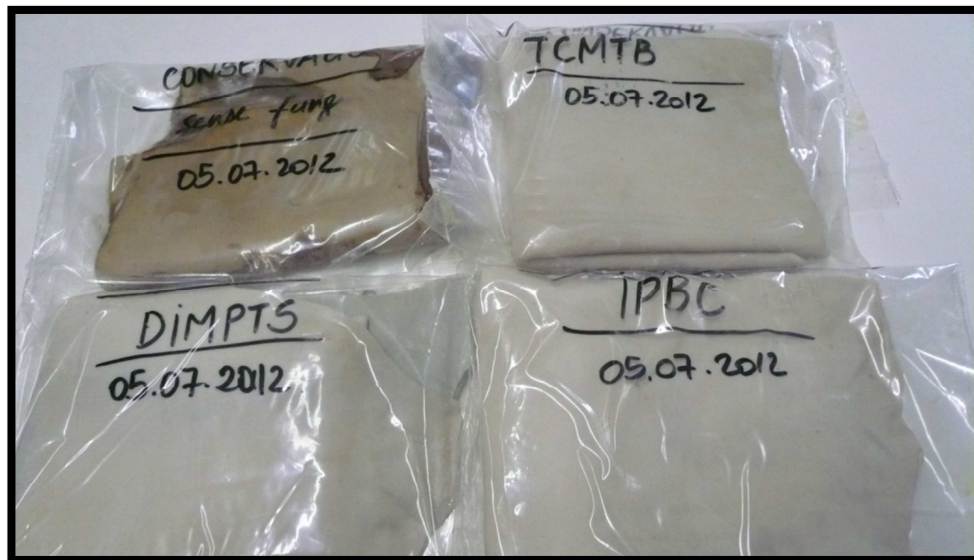
Una quantitat de 0.12% de IPBC és suficient per evitar l'atac del *Penicillium spinulosum* (QF01). Amb el DIMTPS s'ha d'afegir més d'un 0.16%. (Imatge 8.9)



Imatge 8.9. Creixement del *Penicillium spinulosum* (QF01) amb diferents concentracions de DIMPTS i IPBC, sobre pell piquelada. En cada cas, columna d'esquerra a dreta: control, 0.04%, 0.08%, 0.12%, 0.16% de fungicida

5.3. Píquel de conservació i emmagatzematge de les pells durant 3 mesos

Després de mantenir les pells emmagatzemades durant 3 mesos, tapades amb plàstic, apilades de manera semblant a com podrien estar en fàbrica (encara que en una escala molt menor), s'observa una gran diferència entre la pell sense fungicida i les pells a les que se'ls ha afegit antifúngic (Imatge 8.10).



Imatge 8.10. Aspecte de les pells després de tres mesos d'emmagatzematge

La pell a la que no s'ha afegit fungicida està completament contaminada, amb una o més espècies de fongs. Les pells a les que se'ls ha realitzat un píquel de conservació, afegint TCMTB, DIMPTS i IPBC respectivament han aguantat en perfecte estat durant aquest període de temps (Imatge 8.11).



Imatge 8.11. Comparació de la pell sense fungicida amb les pells amb TCMTB, DIMPTS i IPBC, després de tres mesos d'emmagatzematge

L'aspecte i el tacte de les tres pells és l'adequat per seguir amb el procés i obtenir un producte final de qualitat.

5.3.1. Contingut total de fungicida a la pell

La Taula 8.13 mostra el contingut de fungicida restant a la pell; després de realitzar el píquel de conservació, abans d'emmagatzemar les mostres (1), passats tres mesos d'emmagatzematge (2) i després de realitzar tot el procés d'adobament fins a la tintura i engreix (3). Els resultats estan expressats sobre pes de pell assecada en condicions normalitzades (23°C i 50% d'humitat relativa).

FUNGICIDA	mg/kg fungicida (1)	mg/kg fungicida (2)	mg/kg fungicida (3)
TCMTB	198	30	181
DIMPTS	606	166	164
IPBC	434	184	245

Taula 8.13. Contingut de fungicida a les pells, després de piquelar (1), després d'emmagatzemar (2) i després de seguir el procés fins l'engreix (3)

Amb els resultats obtinguts s'observa que el contingut de fungicida a la pell disminueix amb el temps. Tot i que la protecció de la pell segueix sent l'adient després de tres mesos d'emmagatzematge, la disminució del contingut de fungicida a la pell obliga a afegir una petita quantitat d'antifúngic en l'adobament al crom per mantenir la protecció durant el que resta de procés.

Seguer (2002) confirma que la quantitat de TCMTB present a les pells wet blue disminueix al llarg del temps. Observant els resultats obtinguts, en el cas de les pells piquelades la reacció és la mateixa.

6. Conclusions

En un píquel de conservació segueixen produint millor resposta els fungicides diiodometil-p-tolilsulfona (DIMPTS) i 3-iodo-2-propinil-N-butilcarbamat (IPBC) respecte el 2-(tiocianometiltio)-1,3-benzotiazol (TCMTB).

Un 0.11% de cap dels tres fungicides utilitzats no és suficient per evitar el creixement de soques a la pell, però en el cas del DIMPTS i del IPBC, si que evita que la pell quedi completament contaminada, cosa que no passa amb el TCMTB.

L'estudi de quantitats mínimes demostra que es necessita més d'un 0.16% de qualsevol dels dos antifúngics per evitar el creixement del *Trichoderma harzianum* (CECT 2423) en aquest tipus de pell. Per prevenir l'atac de *Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088) es requereix un 0.16% de DIMPTS, en canvi, amb un 0.04% de IPBC és suficient. Davant el *Penicillium spinulosum* (QF01), un 0.12% de IPBC és efectiu, però cal més d'un 0.16% de DIMPTS per protegir la pell.

Les pells emmagatzemades durant 3 mesos en condicions similars a les de fàbrica poden resistir els atacs d'aquests microorganismes durant aquest període amb un 0.15% de TCMTB, DIMPTS o IPBC, a més de mantenir la pell en perfectes condicions.

El contingut de fungicida a la pell disminueix amb el temps. Per això, si es realitza un píquel de conservació, i la pell resta emmagatzemada durant un llarg període, és important afegir més quantitat de fungicida en alguns dels processos posteriors, com pot ser un adobament al crom o un greixatge de pell vegetal.

CAPÍTOL 9

APLICACIÓ DE FUNGICIDES EN GREIXATGE VEGETAL

1. Introducció

Un dels problemes en que es troben els adobers de pell vegetal és l'atac de les pells per part dels fongs durant el procés. Un cop acaba l'adobament i el posterior greixatge, l'espera del següent pas pot exigir a la pell un retard d'una o dues setmanes. És durant aquest període que la pell pot ser atacada per aquests tipus de microorganismes, degut a que en aquest estat la pell confereix unes condicions òptimes pel seu desenvolupament (pH, temperatura, humitat) amb l'afegit de tots els nutrients que els ofereixen els extractes vegetals.

2. Objectius

L'objectiu principal és avaluar la capacitat fungicida del DIMPTS i del IPBC en un greixatge de pell adobada amb extractes vegetals, respecte diferents soques de fongs. Capacitat fungicida que es compararà amb la del TCMTB.

En aquest capítol s'estudiarà l'aplicació dels fungicides al greixatge d'un adobament amb extractes vegetals de pell vacuna, en bombos de laboratori. Per avaluar la capacitat antifúngica, els anàlisis posteriors consistiran en realitzar un control microbiològic de creixement de fongs a la pell, tant davant de les soques adquirides com de les soques aïllades de fàbrica.

Per completar els estudis, s'aplicaran diferents quantitats dels dos fungicides proposats (DIMPTS i IPBC) en el greixatge d'un adobament amb extractes vegetals per determinar la quantitat mínima necessària que es necessitaria per protegir aquests tipus de pell dels diferents fongs escollits.

3. Material i reactius

Els fungicides assajats en la pell vegetal es mostren en la Taula 9.1:

FUNGICIDA	NOM	% PRINCIPI ACTIU
TCMTB	2-(tiocianometiltio)-1,3-benzotiazol	30%
DIMPTS	Diiodometil-p-tolilsulfona	40%
IPBC	3-iodo-2-propinil-N-butylcarbammat	40%

Taula 9.1. Fungicides utilitzats en l'estudi de la protecció de pell vegetal

L'acció fungicida del DIMPTS i del IPBC es compara amb l'eficàcia del TCMTB. Els fongs utilitzats per fer el control de creixement s'indiquen en la Taula 9.2.

MICROORGANISME	nº COL·LECCIÓ
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	CECT 2088
<i>Trichoderma harzianum</i>	CECT 2423
<i>Penicillium spinulosum (QF01)</i>	Soques aïllades
<i>Penicillium decumbens (QF02)</i>	(veure Capítol 4)
<i>Trichoderma harzianum (LL01)</i>	

Taula 9.2. Nom i número de col·lecció dels fongs utilitzats

Es treballa amb suspensió d'espores titulada (10^5 esp./mL) (veure Capítol 3, apartat 4.1.).

Les pells que s'han utilitzat són vacunes de 32kg+, procedents de França. Algunes d'elles amb un adobament vegetal realitzat a fàbrica i altres piquelades.

4. Part experimental

4.1. Greixatge de pell adobada amb extractes vegetals

Es parteix d'una pell adobada amb extractes vegetals que es fragmenta en quatre parts iguals. Tres d'elles per aplicar els tres fungicides escollits (Taula 9.1) i una per realitzar el mateix procediment que la resta, però sense aplicar-hi cap fungicida (control).

Es realitza el greixatge de les quatre mostres al mateix temps i en bombos diferents, seguint la fórmula de la Taula 9.3.

Greixatge	
0.40% àcid oxàlic	
0.40% EDTA dissòdic	
150% H ₂ O	Rodar 20'
100% H ₂ O	Rodar 6'
Escórrer – buidar	
70% H ₂ O	
4.30% Olis (<i>Triglicèrids naturals i additius sintètics sulfatats</i>)	
1.00 % Oli sulfitat	
0.05% Fungicida	
0.25% EDTA dissòdic	Rodar 60'
0.17% àcid oxàlic	Rodar 25'
Escórrer – buidar	
160% H ₂ O	Rodar 1'
Escórrer –buidar	

Taula 9.3. Greixatge de pell vegetal (% sobre pes de pell adobada al vegetal)

Per tots els casos, el fungicida es barreja amb els olis utilitzats i aquesta barreja s'emulsiona perfectament amb aigua a 55°C. Tot i que les pells vegetals proporcionin un medi idoni pel desenvolupament de fongs, la quantitat de fungicida afegida en el procés és menor que en altres casos degut a que el temps susceptible per l'atac d'aquests microorganismes és molt menor.

De cada bombo es reserva:

Mostra de pell humida	Una mostra de pell vegetal humida per realitzar-hi el control de creixement de fongs. Conservada a 4°C.
Mostra de pell seca	Una mostra de pell seca per determinar el contingut total de fungicida. Conservada a temperatura ambient

4.1.1. Control de creixement de fongs sobre pell vegetal

L'estudi de creixement de fongs es realitza per totes les mostres de la mateixa manera que en els casos anteriors (wet blue i píquel de conservació) seguint la norma ASTM D4576-01 (*veure Capítol 3, apartat 4.2*), amb la diferència que per les mostres vegetals només es manté el control durant 20 dies, ja que a fàbrica no és necessari més temps d'emmagatzematge.

4.1.2. Contingut total de fungicida a la pell

Seguint la norma ISO 13365:2011 (*veure Capítol 3, apartat 4.3.*), es determina el fungicida present a les mostres, que prèviament s'han assecat a temperatura ambient.

4.2. Aplicació de diferents quantitats de fungicida

Es parteix d'una pell en estat de píquel. S'adoba amb extractes vegetals seguint la fórmula de la Taula 9.4. Un cop adobada, es divideix la pell en nou mostres i a cadascuna d'elles se li aplica un greixatge d'acord amb la recepta de la Taula 9.5.

Adobament amb extractes vegetals

4 % Extracte de mimosa	
1 % Dispersant naftalen sulfònic	
0.18 % bicarbonat de sodi	
0.26 % Oli sulfatat	Rodar 2h
30 % H ₂ O (a 35°C)	
6 % Extracte de mimosa	Rodar 2h
10 % Extracte de mimosa	
0.5 % Dispersant naftalen sulfònic	Rodar 12h
0.4 % àcid oxàlic	
0.4 % EDTA dissòdic	
50 % H ₂ O	Rodar 1h
Escórrer - buidar	
200 % H ₂ O	Rodar 20'
Escórrer - buidar	
Descarregar pell	
Escórrer pell	

Tabla 9.4. Fórmula del procés d'adobament vegetal (% sobre pes piquelada)

Greixatge

70 % H ₂ O (55°C)	
4,30 % Oli sulfatat	
1 % Oli sulfitat	
X % Fungicida	
0.45 % EDTA dissòdic	Rodar 60'
0.17% àcid oxàlic	Rodar 25'

Escórrer – buidar	
160% H ₂ O	Rodar 1'
Escórrer – buidar	

Tabla 9.5. Fórmula del procés de greixatge de la pell vegetal (% sobre pes de pell adobada i escorreguda)

Les diferents quantitats de fungicida afegit es mostren a la Taula 9.6.

Mostra	Fungicida	Mostra	Fungicida	% fungicida
M1	C1 - DIMPTS	M5	C1 - IPBC	0.02
M2	C2 - DIMPTS	M6	C2 - IPBC	0.04
M3	C3 - DIMPTS	M7	C3 - IPBC	0.06
M4	C4 - DIMPTS	M8	C4 - IPBC	0.08

Tabla 9.6. Diferents quantitats de fungicida afegit en el greixatge de pell vegetal

De cada tros de pell, es reserven les mateixes mostres que en l'apartat anterior:

Mostra de pell humida	Una mostra de pell vegetal humida per realitzar el control de creixement de fongs. Conservada a 4°C.
------------------------------	--

Una mostra de pell seca servirà per determinar-hi el contingut total de fungicida. Es conserva a temperatura ambient, i els resultats de la determinació s'inclouen en l'Annex E.

4.2.1. Control de creixement de fongs sobre la pell vegetal

El control de creixement de fongs sobre les mostres de pell vegetal es realitza per tres soques (Taula 9.7). Per fer-ho, es segueix la norma ASTM D4576-01 (veure Capítol 3, apartat 4.2.).

MICROORGANISME	nº COL·LECCIÓ
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	CECT 2088
<i>Trichoderma harzianum</i>	CECT 2423
<i>Penicillium spinulosum</i> (QF01)	(veure Capítol 4)

Taula 9.7. Nom i número de col·lecció dels fongs utilitzats en aquest apartat

Setmanalment es fa la lectura de resultats i les plaques romanen emmagatzemades durant 30 dies, a 26°C, en atmosfera humida.

5. Resultats

5.1. Greixatge de pell adobada amb extractes vegetals

La Imatge 9.1 mostra l'aspecte de les tres mostres de pell a les que se'ls hi van aplicar els tres fungicides diferents.



Imatge 9.1. Aspecte de la pell vegetal greixada, utilitzant diferents fungicides

Es destaca que cap de les pells presenta taques ni decoloracions. Totes elles mostren un perfecte tacte i acabat.

5.1.1. Control de creixement de fongs sobre pell vegetal

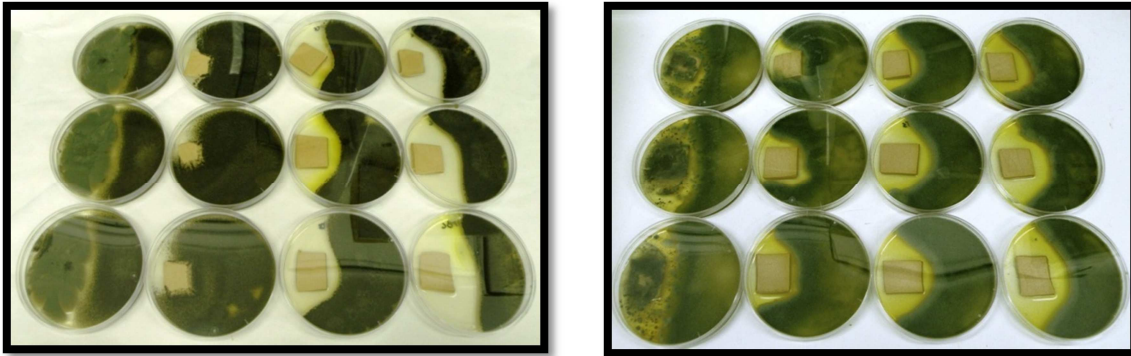
Els resultats per DIMPTS i IPBC es comparen amb els resultats obtinguts utilitzant el TCMTB. A la Taula 9.8 s'inclouen els valors d'invasió a la pell (CS) i la zona d'inhibició (ZI). Tots els valors anotats en l'estudi, junt amb la mitjana i la desviació estàndard s'inclouen en l'Annex D.

FUNGICIDA	<i>Aspergillus brasiliensis</i> CECT 2088		<i>Trichoderma harzianum</i> CECT 2423		<i>Penicillium spinulosum</i> QF01		<i>Penicillium decumbens</i> QF02		<i>Trichoderma harzianum</i> LL01	
	CS	ZI	CS	ZI	CS	ZI	CS	ZI	CS	ZI
CONTROL	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
TCMTB	40	0	9	0	100	0	1	7	77	0
DIMPTS	0	7	0	7	0	2	0	10	0	3
IPBC	0	15	0	13	0	3	0	19	0	6

Tabla 9.8. Resultats de Creixement en superfície (CS) i de Zona d'inhibició (ZI) observats a les diferents mostres de pell vegetal, transcorreguts 20 dies de control.

L'*Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088) envaeix la pell que conté TCMTB, però no ataca a les mostres amb els fungicides alternatius (DIMPTS i IPBC). La pell sense fungicides va quedar contaminada amb un altre tipus de fong (Imatge 9.2).

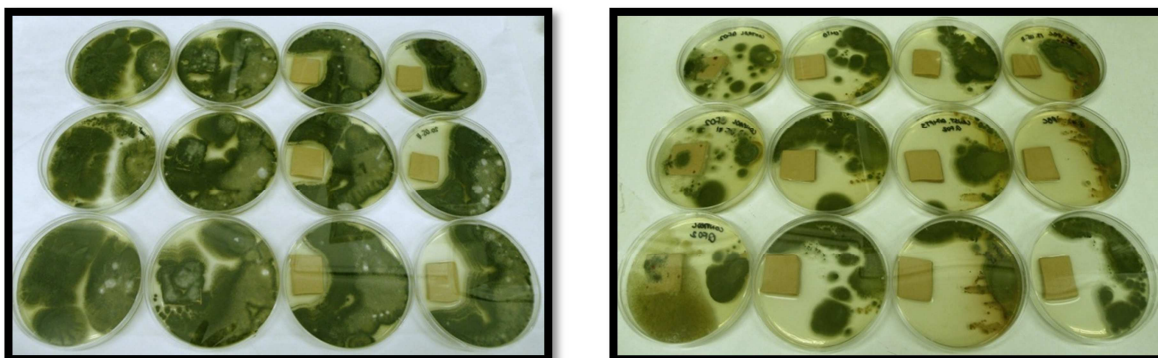
Les pells tractades amb els dos fungicides alternatius mantenen una zona d'inhibició al seu voltant. El TCMTB no és suficient per evitar que les soques ataquin la pell, però tant el DIMPTS com el IPBC mantenen la pell protegida del *Trichoderma harzianum* (CECT 2423) (Imatge 9.3).



Imatges 9.2 i 9.3. Control de creixement de l'*Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088) (esquerra) i el *Trichoderma harzianum* (CECT 2423) (dreta) sobre pell vegetal després de 20 dies de incubació. Columna d'esquerra a dreta: Control, TCMTB, DIMPTS, IPBC.

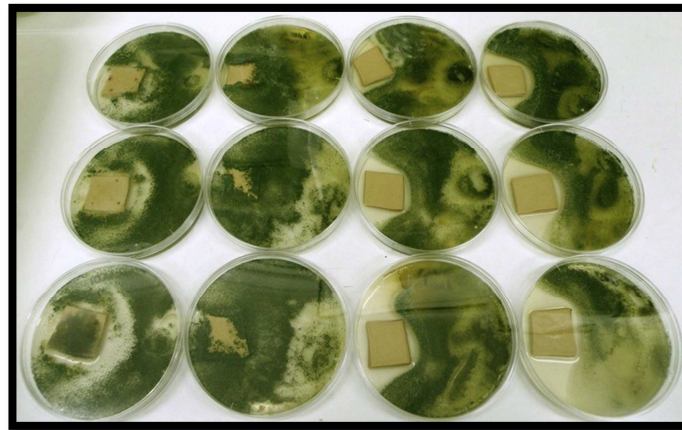
La Imatge 9.4 mostra clarament la diferència entre els fungicides proposats i el TCMTB, enfront el *Penicillium spinulosum* (QF01). Després de 20 dies de incubació, el DIMPTS i el IPBC revelen una major protecció. Transcorregudes dues setmanes, les soques ocupen tota la superfície de la pell tractada amb TCMTB.

L'atac del *Penicillium decumbens* (QF02) és menor que en els altres casos, tot i així, el dos fungicides alternatius protegeixen millor la pell que el TCMTB. (Imatge 9.5)



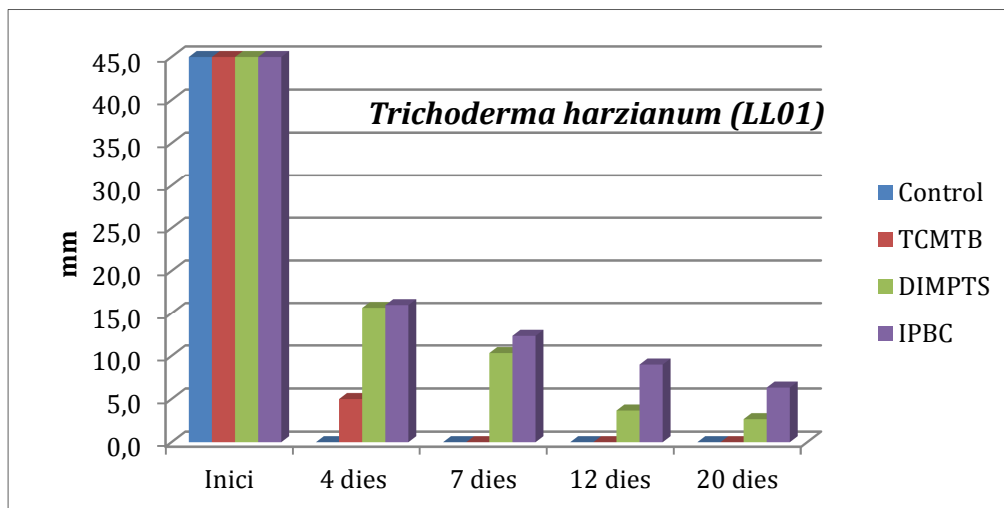
Imatges 9.4 i 9.5. Control de creixement del *Penicillium spinulosum* (QF01), (esquerra) i el *Penicillium decumbens* (QF02) (dreta) sobre pell vegetal després de 20 dies de incubació. Columna d'esquerra a dreta: Control, TCMTB, DIMPTS, IPBC.

Les pells amb DIMPTS i IPBC, tot i projectar una mínima zona d'inhibició, també protegeixen les pells enfront la soca de *Trichoderma harzianum* (LL01) aïllada de fàbrica. La protecció de les pells amb TCMTB és pràcticament nul·la. (Imatge 9.6)



Imatge 9.6. Control de creixement del *Trichoderma harzianum* (LL01) sobre pell vegetal després de 20 dies. Columna d'esquerra a dreta: Control, TCMTB, DIMPTS, IPBC.

La Gràfica 9.1 permet veure l'evolució de la zona d'inhibició dels diferents fungicides davant el *Trichoderma harzianum* (LL01). S'aprecia com aquesta protecció, pel control i pel TCMTB desapareix durant els primers dies.



Gràfica 9.1. Evolució de la Zona d'Inhibició del *Trichoderma harzianum* (LL01) durant 20 dies, sobre pell vegetal

Els cuirs al vegetal són més difícils de protegir del creixement de fongs que els cuirs al crom, degut a que els agents adobants vegetals (polifenols combinats amb hidrats de carboni) ofereixen als fongs un nutrient directe en forma de sucres simples.

5.1.2. Contingut total de fungicida a la pell

La Taula 9.9 inclou el contingut total dels diferents fungicides determinats a la pell vegetal.

Fungicida	mg fungicida/kg de pell
TCMTB	373
DIMPTS	445
IPBC	211

Taula 9.9. Contingut de fungicida a la pell vegetal, resultant de la part experimental de l'apartat 4.1.

Tot i que la quantitat de fungicida afegida és la mateixa, la fixació a la pell no és igual pels tres casos. Es destaca que, tot i que el IPBC presenta major poder antifúngic que el TCMTB, el contingut de IPBC determinat a la pell és molt inferior.

A títol informatiu, segons Hauber (1997), per una protecció efectiva en cas d'un emmagatzematge perllongat de pell wet blue tractada amb fungicides, aquesta hauria de contenir un mínim de 250 ppm de TCMTB. La quantitat pot variar per a cada fungicida i pel tipus de pell.

5.2. Aplicació de diferents quantitats de fungicida

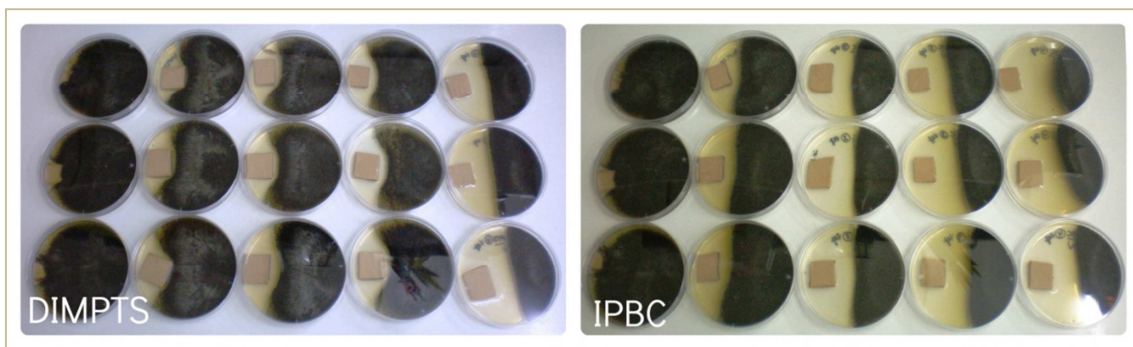
5.2.1. Control de creixement de fongs sobre la pell vegetal

La Taula 9.10 mostra els resultats de percentatge de creixement (CS) de fong sobre la pell i la zona d'inhibició (ZI) de les pells adobades amb extractes vegetals i greixades. Tots els valors obtinguts estan inclosos en l'Annex D. En aquest tipus de procés s'han aplicat quantitats menors de fungicida degut a que les pells en aquest estat només necessiten resistir l'atac fúngic durant unes dues setmanes, entre operacions del procés. S'ha cregut oportú realitzar l'assaig durant 30 dies.

Greixatge vegetal		<i>Aspergillus brasiliensis</i> CECT 2088		<i>Trichoderma harzianum</i> CECT 2423		<i>Penicillium spinulosum</i> QF01	
DIMPTS		CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)
C0	Control	84.3	0	100	0	100	0
C1	0.02	0.3	2	12	0	0.7	0
C2	0.04	0	7	2	4.3	0.2	1
C3	0.06	0	7	0	9.3	0.7	6
C4	0.08	0	21	0	7	0	12
IPBC		CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)
C0	Control	78.3	0	100	0	100	0
C1	0.02	0	10	40	0	0	4
C2	0.04	0	15	11	0	0	8
C3	0.06	0	21	6	0	0	11
C4	0.08	0	26	1	0	0	14

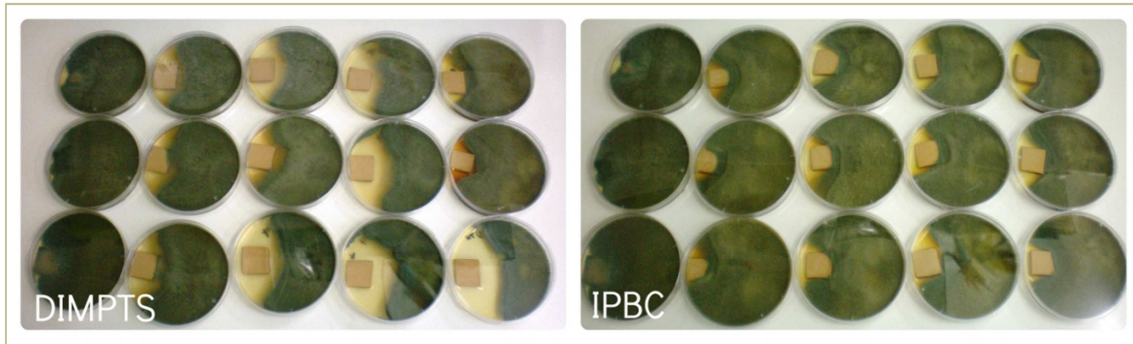
Tabla 9.10. Resultats de Creixement en Superfície (CS) i Zona d'Inhibició (ZI) per les mostres vegetals, amb diferents quantitats de fungicida (DIMPTS i IPBC), passats 30 dies de control

Tot i que les quantitats aplicades són menors que les que s'afegeixen en altres processos, un 0.04% de DIMPTS i un 0.02% de IPBC són suficients per evitar el creixement de *l'Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088). En la Imatge 9.7 s'observa que, encara que existeix poca diferència entre el rang de quantitats afegides de producte (un 0.02%), es distingeix perfectament una zona d'inhibició major com més fungicida s'hi afegeix.



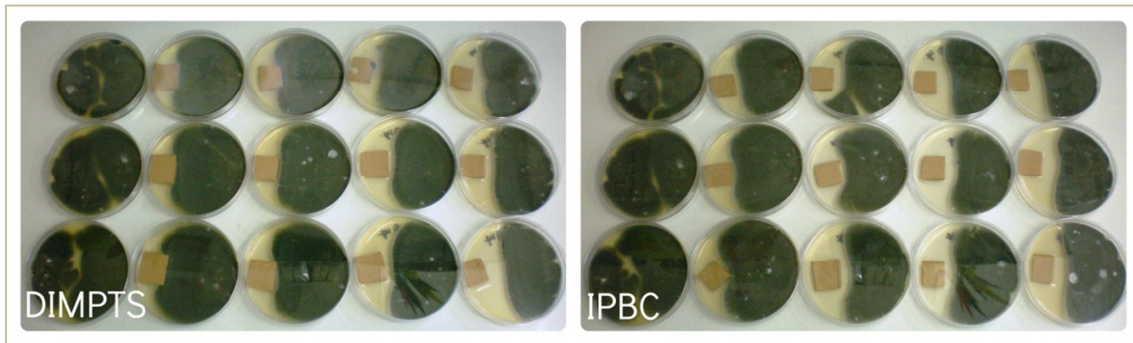
Imatge 9.7. Control de creixement de *l'A. brasiliensis* (CECT 2088) sobre pell vegetal després de 30 dies d'incubació. Columna d'esquerra a dreta: control, 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08% de fungicida

Un 0.06% de DIMPTS és capaç d'evitar l'atac del *Trichoderma harzianum* (CECT 2423), però les quantitats aplicades de IPBC no són les adequades per prevenir l'atac. Observant els resultats, segurament un 0.10% de producte sigui suficient (Imatge 9.8).



Imatge 9.8. Control de creixement del T.harzianum (CECT 2423) sobre pell vegetal després de 30 dies d'incubació. Columna d'esquerra a dreta: Control, 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08% de fungicida

Per últim, per la soca *Penicillium spinulosum* (QF01), la mínima quantitat aplicada de IPBC (un 0.02%) és eficaç per protegir les pells. En canvi, es necessita un 0.08% de DIMPTS per protegir les mostres d'aquest fong aïllat (Imatge 9.9).



Imatge 9.9. Control de creixement del P.spinulosum (QF01) sobre pell vegetal després de 30 dies d'incubació. Columna d'esquerra a dreta: Control, 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08% de fungicida

Tal i com s'ha mencionat anteriorment, la protecció dels cuirs amb adobament vegetal és més difícil degut als nutrients que aporten els agents adobants vegetals als microorganismes.

6. Conclusions

Les quantitats de fungicida aplicades en un greixatge de pell adobada al vegetal són molt inferiors a les quantitats afegides en els altres processos (adobament al crom o píquel). Això és degut a que el temps d'emmagatzematge d'aquest tipus de producte és molt inferior.

Tot i així, s'ha comprovat que un 0.05% dels dos fungicides alternatius proposats (diiodometil-p-tolilsulfona, DIMPTS, i 3-iodo-2-propinil-N-butilcarbamat, IPBC) és suficient per evitar la contaminació de les mostres en aquest estat. En canvi, un 0.05% de 2-(tiocianometiltio)-1,3-benzotiazol (TCMTB) no resulta efectiu per cap de les cinc soques assajades.

Es destaca que el fet d'aplicar qualsevol dels fungicides utilitzats no afecta al cuir resultant. L'aspecte i el tacte esdevenen sense cap mena d'imperficcions ni taques.

En l'estudi de quantitats mínimes aplicades es comprova que inclús un 0.02% de IPBC pot prevenir l'atac de dos dels tres fongs emprats per les proves. Tot i que no sempre es pot aplicar la mínima quantitat de producte ja que la protecció depèn dels fongs que ataquin la pell.

CAPÍTOL 10

DISTRIBUCIÓ ESTRATIGRÀFICA DELS FUNGICIDES A LA PELL

1. Introducció

Existeixen diferents factors que ajuden a aconseguir millors resultats a l'hora de protegir les pells. La quantitat afegida i el temps de contacte són paràmetres importants.

Per comprovar si s'està actuant adequadament, es pot observar la distribució d'un fungicida a l'interior de la pell. D'aquesta manera, es disposa d'una orientació sobre si la protecció a l'interior del cuir és adequada o no. Les tres capes en que dividirem una pell; flor, intermig i carn, poden contenir diferents quantitats de fungicida que protegeixen de manera distinta la pell. Una quantitat major de fungicida a les capes externes pot evitar en major mesura l'entrada de les soques de fongs al cuir.

És important que la molècula penetri a l'interior de la pell, tot i que la concentració en aquesta part sigui inferior a la concentració de les capes externes. Això significarà que l'emulsió ha estat estable durant el temps suficient per assegurar una distribució uniforme. Un contingut nul de fungicida a l'interior de la pell no seria bo, ja que podria ser que la molècula estigués precipitada a la superfície de la pell degut a un procés d'aplicació incorrecte. Això implicaria una distribució molt irregular deixant unes zones molt protegides i altres molt poc.

2. Objectius

L'objectiu principal d'aquesta part és veure com es distribueixen els diferents fungicides dins les tres capes de la pell. L'estudi es realitzarà pels diferents fungicides assajats fins ara (TCMTB, PCMC i OPP, DIMPTS, IPBC i TBZ)

Es compararà la distribució estratigràfica dels productes antifúngics dins de dos tipus diferents de pell; pell wet blue i pell vegetal.

3. Material i reactius

Els fungicides dels que s'ha determinat la seva distribució estratigràfica dins la pell es mostren a la Taula 10.1.

FUNGICIDA	NOM	% PRINCIPI ACTIU
TCMTB	2-(tiocianometiltio)-1,3-benzotiazol	30%
Fenòlics (PCMC+OPP)	p-cloro-m-cresol + o-fenilfenol	42%
DIMPTS	Diiodometil-p-tolilsulfona	40%
IPBC	3-iodo-2-propinil-N-butilcarbamat	40%
TBZ	Tiabendazol	60%

Taula 10.1. Fungicides utilitzats en la determinació estratigràfica de fungicida

En el cas de la pell wet blue s'han utilitzat els cinc fungicides de la Taula 10.1. Per la pell vegetal només s'han seleccionat els productes alternatius que han mostrat millor resultat, DIMPTS i IPBC, i com a referència el TCMTB.

En el cas del píquel de conservació no es pot realitzar aquest assaig ja que la pell en aquest estat és molt prima i no és possible dividir-la en les tres capes corresponents.

4. Part experimental

4.1. Pell wet blue

La pell que s'utilitza per determinar la distribució estratigràfica de fungicida és la resultant d'aplicar el procés explicat la Taula 7.3 de l'apartat 4.1. del Capítol 7(I).

La pell adobada al crom amb cadascun dels fungicides seleccionats es deixa assecar a temperatura ambient (pell assecada en condicions normalitzades; 23°C i 50% d'humitat relativa). Un cop seca, es divideix en capes amb la màquina de dividir (*veure Capítol 3, apartat 3.7.*). La Figura 10.1 mostra un esquema de com es realitza aquesta divisió de la pell en les tres capes corresponents: capa flor, capa intermitja i capa carn.

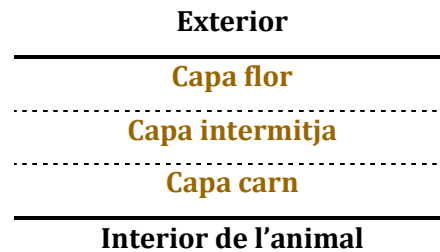


Figura 10.1. Esquema de la divisió de la pell en capes

Cada capa es tritura amb el molí (veure Capítol 3, apartat 3.10) per obtenir pols de pell i fer la determinació de fungicides per cromatografia líquida. L'anàlisi es fa seguint la norma EN ISO 13365, per a la determinació de fungicides en pell (veure Capítol 3, apartat 4.2).

El dissolvent d'extracció utilitzat és acetonitril en tots els casos, excepte pel tiabendazol, que s'utilitza metanol degut a la baixa solubilitat d'aquest en acetonitril.

4.2. Pell vegetal

Es parteix d'una pell de vaca a la que se li ha realitzat un primer semi-adobament amb extractes vegetals a fàbrica. Es segueix amb la continuació del procés d'adobament a la planta pilot de l'Escola d'Enginyeria d'Igualada, seguint la fórmula de la Taula 10.2.

Adobament amb extractes vegetals (continuació)	
4% Extracte de mimosa	
0.18% bicarbonat de sodi	
0.26% oli sulfatat	Rodar 2h
20% H ₂ O (T ^a 35°C)	
5% Extracte de mimosa	Rodar 2h
7% Extracte de mimosa	
1.5% Dispersant naftalen sulfònic	Rodar 12h
0.40% àcid oxàlic	
0.40% EDTA dissòdic	
150% H ₂ O	Rodar 20'
Escórrer - buidar	
100% H ₂ O	Rodar 6'
Escórrer - buidar - Escórrer amb rodet	

Taula 10.2. Continuació formulació adobat de pells vegetals (% sobre pes de pell semi-abodada)

La pell adobada es fracciona en quatre parts iguals per treballar cadascuna d'elles amb el fungicida corresponent (TCMTB, DIMPTS i IPBC, i sense fungicida) als bombos de laboratori.

Es pesen les pells i a partir d'aquí es fa el greixatge de cadascuna per separat, seguint la recepta de la Taula 10.3. A una de les mostres se li aplica el greixatge sense afegir fungicida (control).

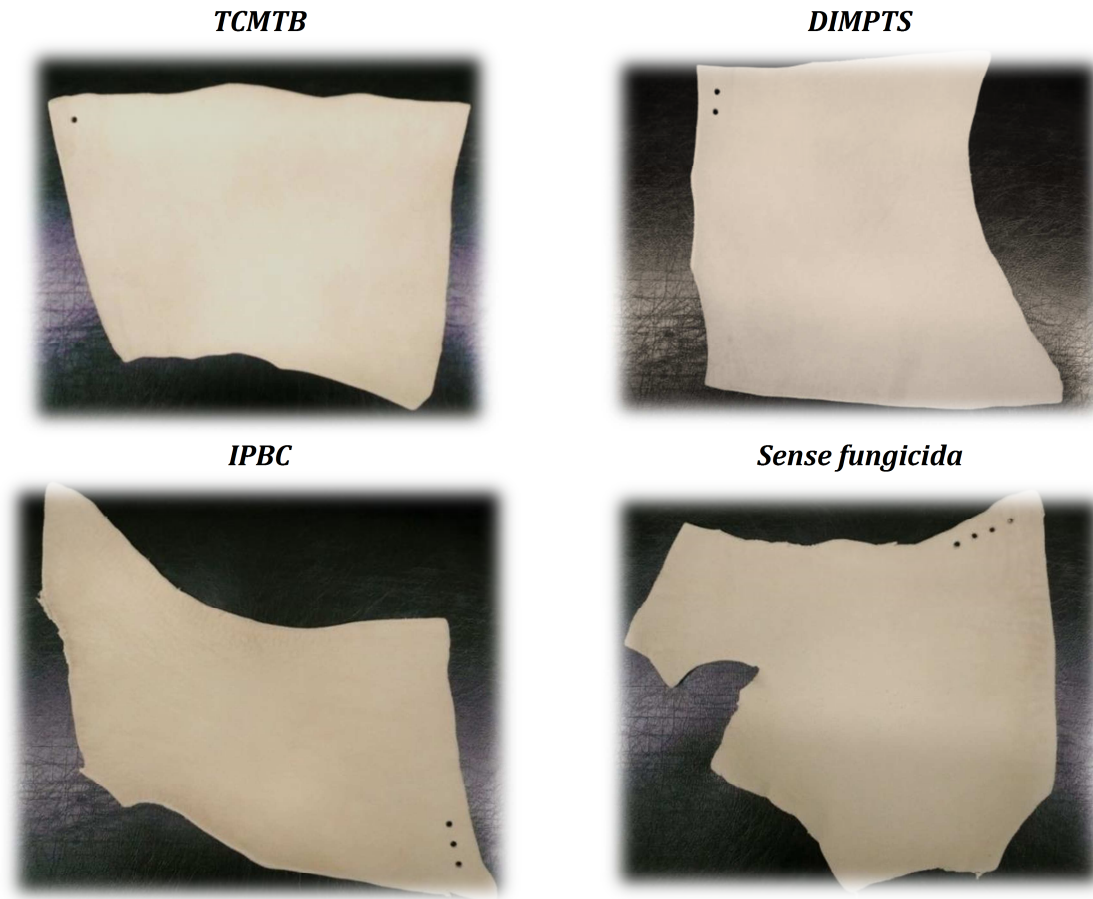
Greixatge de pell vegetal	
70% H ₂ O (T ^a 55°C)	
4.3% Oli sulfatat	
1% oli sulfitat	
0.05% Fungicida	
0.45% EDTA dissòdic	Rodar 60'
0.17% àcid oxàlic	Rodar 25'
Escórrer – buidar	
160% H ₂ O	Rodar 1'
Escórrer – buidar	

Taula 10.3. Greixatge de la pell adobada al vegetal (% sobre pes de pell escorreguda)

El TCMTB i el DIMPTS s'afegeixen al bombo junt amb la barreja d'olis emulsionats. El IPBC s'afegeix directament, sense diluir.

Les pells resultants es deixen assecar a temperatura ambient, ben planes per aconseguir un assecatge adequat.

La Imatge 10.1 mostra l'aspecte de les diferents mostres obtingudes de pell vegetal. Cap d'elles presenta taques ni imperfeccions. Totes mostren un perfecte acabat de la fase humida i evidencien un tacte suau, molt ben greixades i adobades.



Imatge 10.1. Aspecte de les pells vegetals seques

De la mateixa manera que per la pell wet blue, les mostres es divideixen en tres capes (veure apartat 4.1, Figura 10.1). La Imatge 10.2 mostra l'aspecte de les pells després de dividir-les.



Imatge 10.2. Aspecte de les pells vegetals dividides en capes

Es trituren per obtenir pols de pell utilitzant el molí (veure Capítol 3, apartat 3.10.) i procedir amb els anàlisis de determinació de fungicida a la pell seguint la norma EN ISO 13365 (veure Capítol 3, apartat 4.2).

5. Resultats

5.1. Pell wet blue

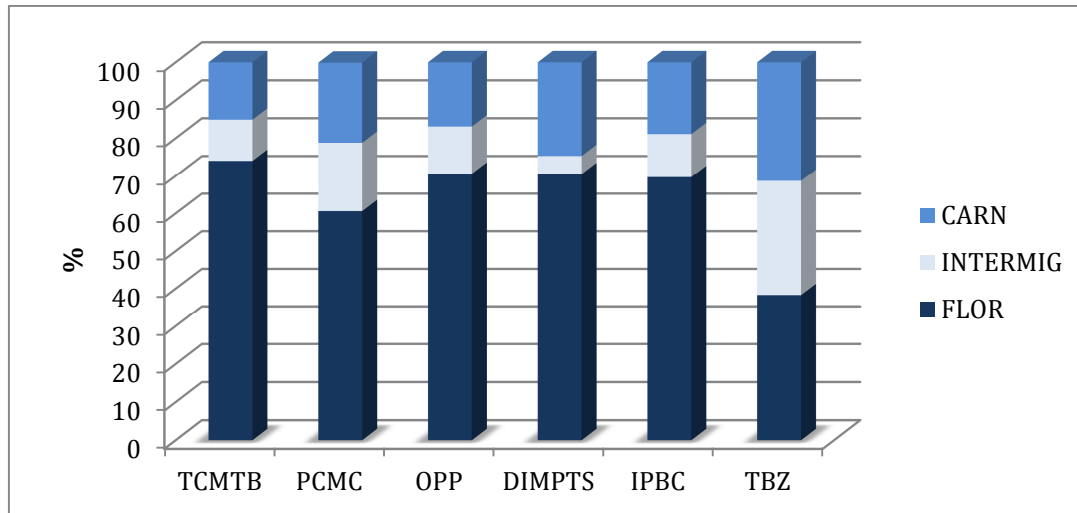
En la Taula 10.4 s'inclou el percentatge total dels diferents fungicides determinats a les tres capes de pell.

<i>Percentatge total de fungicida (%)</i>						
Pell wet blue	TCMTB	Mescla fenòlics		DIMPTS	IPBC	TBZ
		PCMC	OPP			
Capa Flor	74.0	60.6	70.6	70.5	69.7	38.3
Capa Intermitja	10.9	18.2	12.5	4.8	11.4	30.4
Capa Carn	15.1	21.1	16.9	24.7	18.9	31.3

Taula 10.4. Percentatge total de fungicida (%) present a cada capa de pell wet blue

Segons Hauber (1997), la distribució del fungicida en les capes d'una pell bovina és diferent, i es pot generalitzar resumint que la capa flor conté un 60-70%, la capa intermitja un 10-20% i la capa carn pot absorbir un 25-30% de fungicida. Els resultats obtinguts (Taula 10.4) mostren que pràcticament tots els productes analitzats compleixen amb aquests criteris, excepte el tiabendazol, que es distribueix uniformement a les tres capes de la pell. Potser aquest sigui un dels motius pels quals la protecció que ofereix aquest producte no és l'adequada per aquest tipus de procés. Pot ser que una protecció major a l'exterior de la pell eviti en major grau l'entrada de les espores des de l'exterior.

Els valors de la Taula 10.4 es poden representar com a la Gràfica 10.1:



Gràfica 10.1. Distribució dels fungicides en les diferents capes de pell wet blue

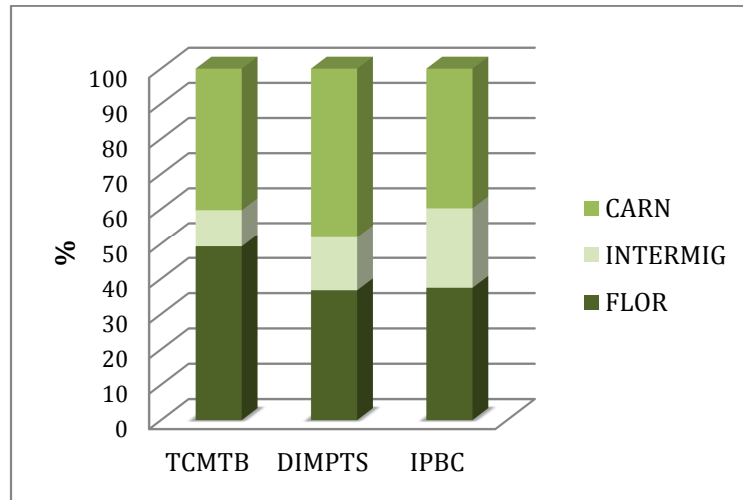
5.2. Pell vegetal

La Taula 10.5 mostra la distribució estratigràfica dels tres fungicides seleccionats dins la pell adobada amb extractes vegetals.

<i>Percentatge total de fungicida (%)</i>			
Pell vegetal	TCMTB	DIMPTS	IPBC
Capa Flor	49.3	36.7	37.4
Capa Intermitja	10.4	15.2	22.8
Capa Carn	40.3	48.1	39.8

Taula 10.5. Percentatge de fungicida (%) present a cada capa de pell vegetal

El fungicida es distribueix dins la pell com mostra la Gràfica 10.2.



Gràfica 10.2. Distribució de fungicides en les capes de pell vegetal

La manera com es distribueix el fungicida a les diferents capes de pell vegetal varia respecte la pell wet blue. Es confirma que la major quantitat de fungicida es distribueix per igual en les dues capes externes de la pell (entre un 35-50% en cadascuna), i a l'interior de la pell només s'hi diposita entre un 10-25% de producte.

5.3. Comparativa de resultats

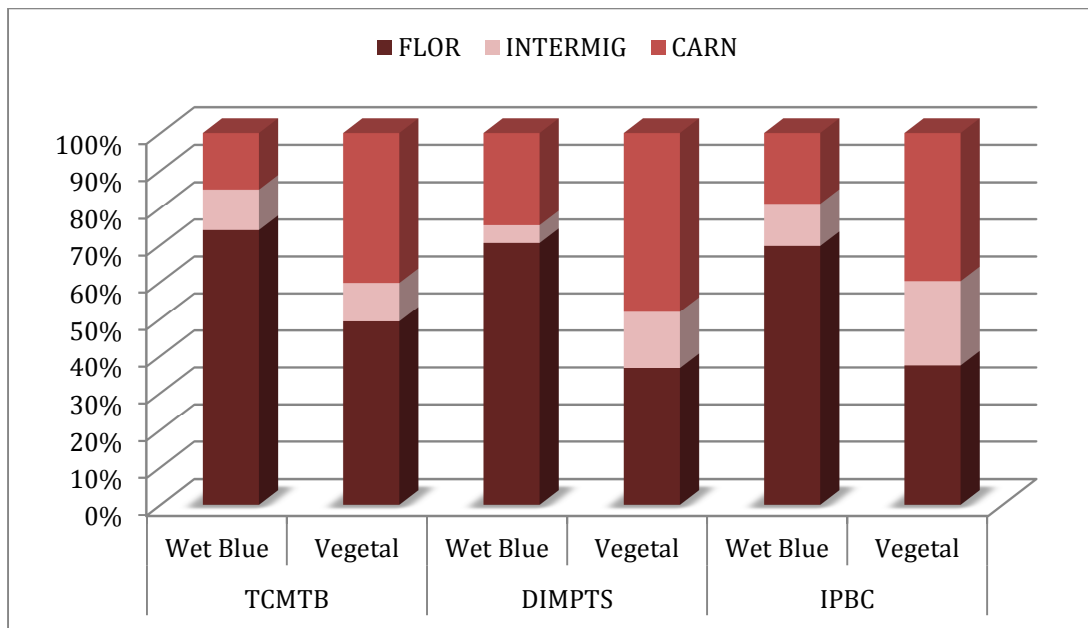
Els resultats obtinguts (Taula 10.6) mostren que en el cas de l'adobament al crom pràcticament tots els productes analitzats compleixen els criteris assenyalats per Hauber (1997). En canvi, per la pell adobada amb extractes vegetals, el fungicida es diposita pràcticament de la mateixa manera a les capes externes de la pell, deixant menys producte a l'interior.

Com per la pell vegetal l'estudi només es va fer per tres fungicides, la comparativa només es refereix a aquests tres productes.

Percentatge total de fungicida (%)						
	TCMTB		DIMPTS		IPBC	
	Wet Blue	Vegetal	Wet Blue	Vegetal	Wet Blue	Vegetal
Flor	74.0	49.3	70.5	36.7	69.7	37.4
Intermig	10.9	10.4	4.8	15.2	11.4	22.8
Carn	15.1	40.3	24.7	48.1	18.9	39.8

Taula 10.6. Percentatge total de fungicida (%) contingut en cada capa de pell en els dos tipus d'adobament

La comparativa de forma gràfica entre les dues pells es representa a la Gràfica 10.3.



Gràfica 10.3. Comparativa de la distribució estratigràfica de fungicides a la pell (wet blue i greixatge vegetal)

S'observa que la distribució estratigràfica és diferent en els dos tipus de processos. Així com per les pells wet blue la major concentració de fungicida (entre un 60-70%) es diposita a la capa flor, en el cas de la pell adobada amb extractes vegetals, la capa flor i la capa carn posseeixen una quantitat de fungicida similar (35-50%), deixant la menor concentració a l'interior (10-20%).

Aquesta diferència pot ser deguda a que es tracta de dos processos diferents. Per una banda, un adobament al crom, que s'aplica sobre pell no rebaixada, molt compacta i molt gruixuda, en un entorn salí i molt inorgànic. Per altra banda, en el cas del greixatge vegetal, el fungicida s'addiciona en una emulsió de greixos, amb un alt contingut de tensioactius que ajuden a dispersar i penetrar la molècula a la pell junt amb els greixos, en una pell ja rebaixada i molt més prima.

És important destacar que l'estudi de distribució estratigràfica de producte fungicida a l'interior de la pell no s'ha realitzat per a les pells piquelades degut a la dificultat que comporta dividir aquest tipus de pell. Les pells en estat de píquel són molt primes i resulta pràcticament impossible dividir-les en capes.

6. Conclusions

La distribució dels fungicides avaluats dins la pell wet blue segueix els criteris sostinguts per Hauber (1997), que confirmen que en una pell bovina, la distribució de producte a l'interior és diferent entre les capes. Es pot generalitzar resumint que la capa flor conté un 60-70%, la capa intermitja un 10-20% i la capa carn pot absorbir un 25-30% de fungicida.

En tots els casos estudiats, excepte amb el tiabendazol (TBZ), es compleixen aquests criteris. El TBZ és un producte que s'ha descartat després de realitzar les primeres proves de la tesi degut a la seva baixa eficàcia. Després d'observar la distribució del producte a la pell, el fet de que a les capes externes s'hi dipositi una quantitat més baixa pot ser la causa d'una menor protecció enfront els microorganismes provinents de l'exterior.

Un fet no documentat amb anterioritat és la diferència que existeix entre la distribució dels fungicides dins la pell wet blue i dins la pell greixada vegetal. Un mateix antifúngic es distribueix de manera molt diferent a les capes de cada tipus de pell analitzada. Així com per la pell wet blue, la major quantitat de fungicida es troba a la capa flor (entre un 60-70%), seguit per la capa carn (25-30%); per a la pell vegetal, les dues capes externes contenen la mateixa quantitat de producte aproximadament (entre un 35-50%), deixant una menor quantitat a la capa intermitja.

Aquest factor pot ser degut a les diferències que existeixen entre aquests dos tipus de processos i les condicions que confereix la pell en aquests dos estats. Mentre que per l'adobament al crom es disposa d'una pell gruixuda, no rebaixada, molt compacte, en un entorn salí i inorgànic, per realitzar el greixatge vegetal, es disposa d'una pell més prima, ja rebaixada, i els fungicides s'afegeixen emulsionats amb els greixos, acompanyats de tensioactius que ajuden a la seva penetració.

El que sí que es confirma és que tots els fungicides (excepte el TBZ) segueixen els mateixos criteris a l'hora de distribuir-se a l'interior d'un mateix tipus de pell.

CAPÍTOL 11

TOXICITAT DE LES AIGÜES RESIDUALS I VIABILITAT ECONÒMICA

1. Introducció

Un dels factors a tenir en compte a l'hora de buscar alternatives és la toxicitat. El TCMTB és un dels fungicides més utilitzats actualment en adoberies, però està limitat degut als alts índexs de toxicitat que provoca en les aigües residuals dels processos. Aquesta és una de les principals causes per les que existeix la necessitat de buscar alternatives a aquest antifúngic.

Per això, l'estudi de la toxicitat dels banys residuals dels processos en els que s'han utilitzat fungicides alternatius serà un factor important a valorar.

La viabilitat econòmica d'utilitzar uns o altres productes no deixa de ser un altre dels elements a considerar. Per una adoberia interessada en utilitzar els fungicides proposats, serà de vital importància considerar aquest paràmetre.

2. Objectius

L'objectiu principal és fer una comparativa de la toxicitat detectada en els banys residuals de processos (adobament al crom, píquel de conservació i greixatge de pell vegetal) en els que s'han utilitzat diferents productes antifúngics.

Un estudi econòmic de les diferents opcions proposades completarà la informació sobre les alternatives als fungicides convencionalment utilitzats per protegir les pells.

3. Material i reactius

Els fungicides dels quals s'ha determinat la toxicitat de les aigües residuals dels processos es mostren a la Taula 11.1.

FUNGICIDA	NOM	% PRINCIPI ACTIU
TCMTB	2-(tiocianometiltio)-1,3-benzotiazol	30%
Fenòlics (PCMC+OPP)	p-cloro-m-cresol + o-fenilfenol	42%
DIMPTS	Diiodometil-p-tolilsulfona	40%
IPBC	3-iodo-2-propinil-N-butylcarbamat	40%
TBZ	Tiabendazol	60%

Taula 11.1 Fungicides utilitzats per determinar la toxicitat dels banys i fer l'estudi econòmic

L'anàlisi econòmic només s'ha fet pels fungicides alternatius que millor resultat han donat en els estudis desenvolupats en els capítols anteriors (DIMPTS i IPBC), agafant com a referència el TCMTB.

4. Part experimental

4.1. Determinació de la toxicitat dels banys residuals

S'han reservat banys dels tres processos considerats fins ara per determinar la toxicitat de les seves aigües residuals. Es determina la toxicitat segons la norma de qualitat de l'aigua UNE EN ISO 11348-3:2009, utilitzant el mètode Microtox (*veure Capítol 3, apartat 4.4.*). D'aquesta manera es pot comparar l'impacte mediambiental que suposa aplicar els diferents fungicides alternatius respecte als convencionals.

Els processos dels que s'han reservat els banys són: adobament al crom (*apartat 4.2.*), píquel de conservació (*apartat 4.3.*) i greixatge d'una pell adobada amb extractes vegetals (*apartat 4.4.*).

Es determina la toxicitat d'un bany sense fungicides afegits (blanc o de referència) de cadascun dels processos i es compara amb la toxicitat produïda pels banys de les operacions en les que s'han afegit els productes estudiats. Per això, de cada una de les fórmules descrites a continuació es realitza un procés sense afegir fungicida, que serà la referència en cada cas.

Els banys obtinguts s'han guardat congelats fins el moment de realitzar les anàlisis. D'aquesta manera es conserven totes les seves propietats.

4.2. Adobament al crom

En el cas de l'adobament al crom, la formulació descrita a la Taula 11.2 s'aplica per cadascun dels cinc fungicides descrits a la Taula 11.1. Pel bany de referència se segueix el mateix procediment però sense afegir fungicida.

Adobament al crom	
60% H ₂ O	
4% clorur de sodi	
4% sal de crom 33% basicitat	Rodar 60'
0.1% fungicida	Rodar 60'
4% sal de crom 33% basicitat	Rodar 3h
1% formiat de sodi	Rodar 3h
Nit en repòs	
Controlar el pH (entre 2,8 – 3)	
1-1.5% bicarbonat de sodi	Rodar 90'
Controlar el pH (entre 3,5 – 4)	
0.1% fungicida	Rodar 60'
Escórrer - buidar	
100% H ₂ O	Rodar 15'
Escórrer - buidar	

Taula 11.2. Adobament al crom. (% sobre pes de pell tripa)

Els banys utilitzats per determinar la toxicitat són els que s'han obtingut del procés aplicat a l'apartat 4.1. del Capítol 7.

4.3. Píquel de conservació

En el cas de la pell piquelada, només es realitzen tres processos, utilitzant tres fungicides diferents (TCMTB, DIMPTS i IPBC), més el de referència. La recepta del píquel de conservació seguida en cada cas es mostra a la Taula 11.3. Els banys utilitzats són els banys residuals del procés aplicat en l'apartat 4.3.1. del Capítol 8.

Píquel de conservació

2 % clorur de sodi	
0.25 % àcid sulfúric	
0.15% fungicida	Rodar 3h i intermitent
Nit en repòs	
Comprovar pH	Rodar 2'
Escórrer - buidar	

Taula 11.3. Píquel de conservació (% sobre pes de pell semi-piquelada)

4.4. Greixatge vegetal

El procés de greixatge només es realitza per tres dels cinc fungicides de la Taula 11.1 (TCMTB, DIMTPS i IPBC) més el de referència (sense fungicida). Es parteix d'una pell semi-adobada amb extractes vegetals a la que se li apliquen les fórmules de les Taules 11.4 i 11.5.

Adobament amb extractes vegetals (continuació)

4% Extracte de mimosa	
0.18% bicarbonat de sodi	
0.26% oli sulfatat	Rodar 2h
20% H ₂ O (T ^a 35°C)	
5% Extracte de mimosa	Rodar 2h
7% Extracte de mimosa	
1.5% Dispersant naftalen sulfònic	Rodar 12h
0.40% àcid oxàlic	
0.40% EDTA dissòdic	
150% H ₂ O	Rodar 20'
Escórrer - buidar	
100% H ₂ O	Rodar 6'
Escórrer - buidar - Escórrer amb rodet (mans)	

Taula 11.4. Continuació de la formulació adobament de pells vegetals (% sobre pes de pell semi-abodada)

La pell adobada es parteix en quatre parts iguals per treballar cadascuna d'elles amb el fungicida corresponent, més el de referència, als bombos de laboratori.

Es pesen les mostres i a partir d'aquí es fa el greixatge de cada pell per separat, seguint la recepta de la Taula 11.5.

Greixatge de pell vegetal	
70% H ₂ O (T ^a 55°C)	
4.3% Oli sulfatat	
1% oli sulfitat	
0.05% Fungicida	
0.45% EDTA dissòdic	Rodar 60'
0.17% àcid oxàlic	Rodar 25'
Escórrer – buidar	
160% H ₂ O	Rodar 1'
Escórrer – buidar	

Taula 11.5. Greixatge de la pell adobada al vegetal (% sobre pes de pell escorreguda)

Els banys utilitzats són els banys residuals del procés seguit a l'apartat 4.2. del Capítol 10.

5. Resultats

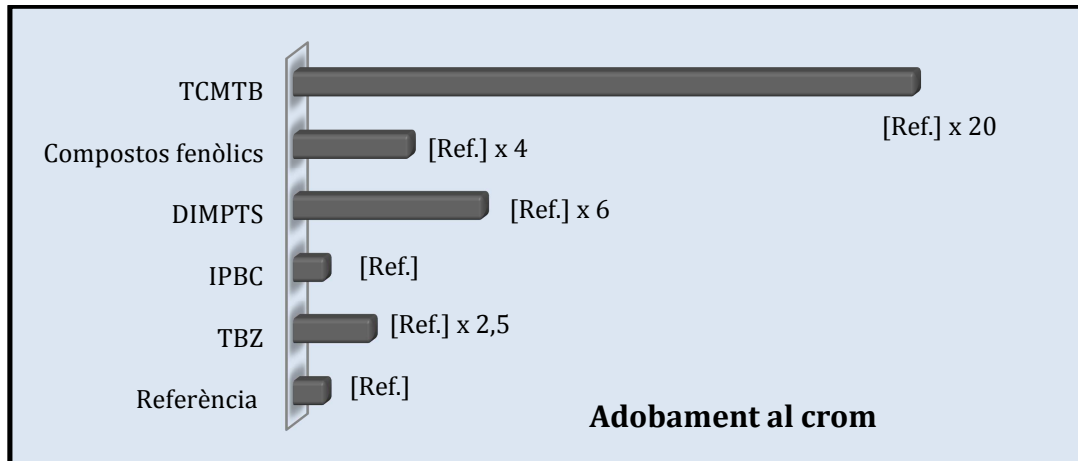
5.1. Determinació de la toxicitat dels banys residuals

Per a cada procés es representa una gràfica amb els resultats obtinguts de la toxicitat de cada bany. Aquests valors de toxicitat es relacionen amb el valor de referència, de la toxicitat del bany on no s'hi han afegit productes antifúngics. En tots coincideix, que el valor de les matèries inhibidores del bany amb TCMTB és, amb diferència, el major de tots. Aquesta és una de les problemàtiques que acompanyen sempre a aquest producte, i que fa que existeixi la necessitat de substituir-lo. Seguer et al. (2002) descriuen valors alts de toxicitat del TCMTB, i per tant la recerca d'alternatives que protegeixin la pell amb la mínima toxicitat en el bany esgotat.

És important destacar que el TCMTB és mediambientalment inestable. És estable al pH àcid dels banys residuals, però es degrada progressivament a pH 7. La taxa de la hidròlisis augmenta ràpidament a valors de pH més alts. Això significa que en les condicions de la planta de tractament d'aigües residuals, la toxicitat del TCMTB és molt menys important que en les condicions dels banys residuals. Aquest mateix factor d'inestabilitat a pH's àcids es repeteix per les molècules DIMPTS i IPBC.

5.2. Adobament al crom

La Gràfica 11.1 representa la toxicitat determinada en els banys de l'adobament al crom, prenent com a referència la toxicitat de les aigües residuals del mateix procés però sense fungicida afegit.



Gràfica 11.1. Toxicitat dels banys residuals de l'adobament al crom, respecte el bany de referència

La major toxicitat la presenta el TCMTB, fins a 20 vegades la toxicitat del bany sense fungicida. Estudis previs confirmen que la hidròlisi del TCMTB depèn del pH. El TCMTB és hidrolíticament estable en condicions abiòtiques i tamponades a pH 5, i es degrada lentament a pH 7. Sota condicions més alcalines, la hidròlisi ocorre més ràpidament amb una vida mitjana calculada de 1.8 a 2.1 dies. (EPA 2006)

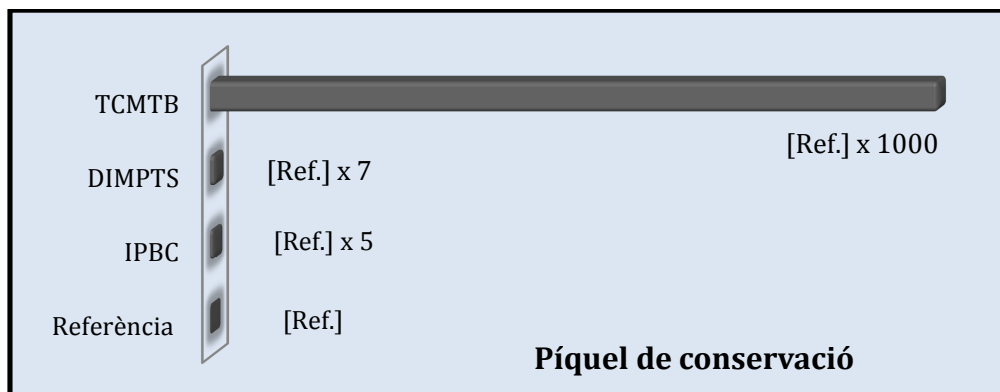
Els tres fungicides proposats com alternatius (DIMPTS, IPBC i TBZ) presenten una toxicitat molt més baixa, així com la barreja de fenòlics (entre 1 i 6 vegades la toxicitat del bany sense fungicides), destacant que el resultat de la toxicitat produïda pel bany amb IPBC és igual a la que es determina en el bany de referència.

Tot i que la molècula IPBC no presenta cap tipus de toxicitat afegida, Blumhorst (1990) va estudiar la hidròlisi aquosa d'un producte pur de IPBC (99.6% de principi actiu) en solucions tamponades a pH 5, 7 i 9, a 25°C. A pH 9, la molècula va patir una ràpida degradació establint la seva vida mitjana en menys de 24 hores, l'únic metabòlit detectat va ser propargil butil carbamat (PBC). A pH 7, la degradació va ser més lenta, amb una vida mitjana de 139 dies. A pH 5, el IPBC és hidrolíticament estable, no es va observar degradació del producte.

En el cas del DIMTPS, la seva utilització pot donar lloc a la seva alliberació al medi ambient directament a l'atmosfera o al sòl. En fase vapor, el DIMPTS es degrada per reacció amb radicals hidroxil produïts fotoquímicament i la vida mitjana per a aquesta reacció en l'aire s'estima en 23 hores. El seu BCF (*Factor de Bioconcentració*) suggereix que el potencial de bioconcentració en organismes aquàtics és moderat. Es coneix que el DIMPTS és estable a pH 5, però s'hidrolitza i es degrada a pH 7 i 9 per formar monoïode-p-tolilsulfona amb vides mitjanes que van des 1,5 a 9,6 dies. (EPA 2008)

5.3. Píquel de conservació

La toxicitat produïda pels banys del píquel de conservació respecte el bany de referència es representa a la Gràfica 11.2.



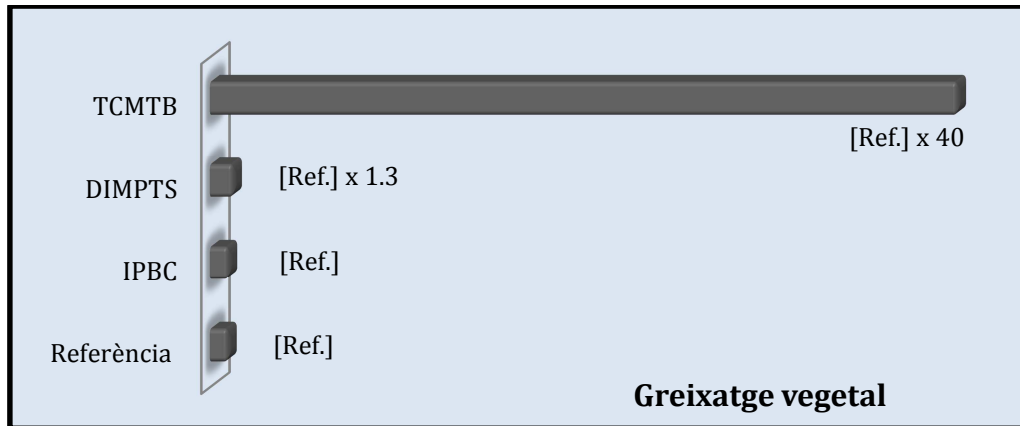
Gràfica 11.2. Toxicitat dels banys residuals del píquel de conservació, respecte el bany de referència

El TCMTB presenta una toxicitat desmesurada comparada amb la del bany de referència, pràcticament 1000 vegades la toxicitat de les aigües del procés sense fungicida. A pH's àcids la toxicitat del TCMTB és elevada, ja que la molècula és estable. A mesura que el pH és més alcalí, la toxicitat del TCMTB va disminuint degut a que la molècula es va degradant. A pH 5, el TCMTB és estable, a pH 7, el TCMTB s'hidrolitza lentament, i a pH 9 la hidròlisi ocorre ràpidament. (Meding et al. 1993)

El DIMPTS i el IPBC difereixen menys del valor de toxicitat del bany de referència (entre 7 i 5 vegades respectivament), tot i que, així com ocorre amb el TCMTB, les molècules DIMPTS i IPBC també pateixen la seva degradació a pH's més alcalins.

5.4. Greixatge vegetal

La toxicitat dels banys del greixatge vegetal segueix la pauta dels anteriors. Es representa en la Gràfica 11.3.

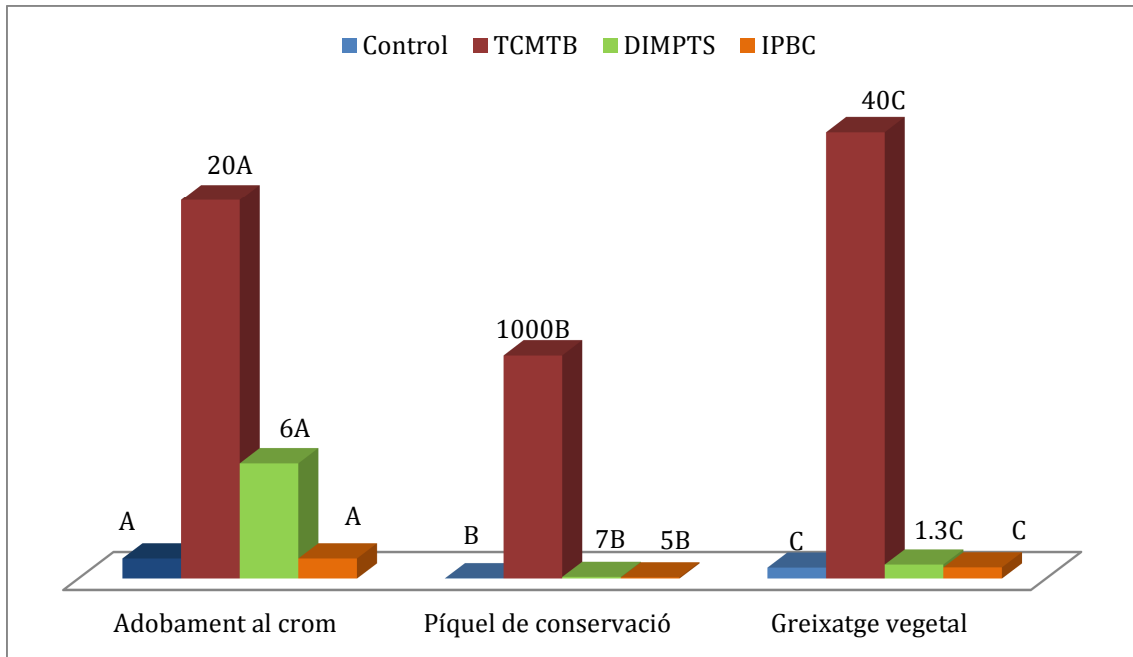


Gràfica 11.3. Toxicitat dels banys residuals del greixatge vegetal, respecte el bany de referència

La toxicitat dels banys amb TCMTB és fins a 40 vegades la toxicitat presentada pel bany del greixatge vegetal sense fungicida. La toxicitat produïda pel IPBC és la mateixa que la del bany on no s'hi han afegit fungicides, i la del DIMPTS pràcticament també (només 1.3 vegades la toxicitat de les aigües residuals del bany de referència)

5.5. Comparació de resultats

A la Gràfica 11.4 es compara la toxicitat de les aigües residuals dels diferents processos. La primera columna de cada cas correspon a la toxicitat del bany sense fungicida afegit, i el valor determinat (que s'ha anomenat com A, B i C, respectivament) es pren com a referència per avaluar la toxicitat de la resta de banys.



Gràfica 11.4. Comparació de la toxicitat dels banys residuals dels tres processos estudiats. Tots ells comparats amb un bany sense fungicida o de referència (control), per cada cas.

La Gràfica 11.4 mostra que en el cas del píquel de conservació, malgrat ser on existeix més diferència entre la presència i absència de TCMTB, és on les aigües residuals són menys tòxiques. En l'Annex F s'inclou la mateixa gràfica però amb els valors absoluts de toxicitat.

Com s'ha vist en els apartats anteriors, la major toxicitat, i amb diferència, la presenta el TCMTB, una de les grans problemàtiques que sempre acompanya a aquest producte. No obstant, estudis sobre la contaminació de la molècula confirmen que el TCMTB es degrada ràpidament. La Figura XII mostra el camí i el punt final de la hidròlisi de la molècula del TCMTB en el medi ambient aquàtic (Brownlee et al. 1992). Tot i així, diferents estudis sobre la toxicitat del TCMTB confirmen que els diferents compostos en que es degrada el TCMTB són menys tòxics que el propi TCMTB. (Nawrocki S.T. 2005)

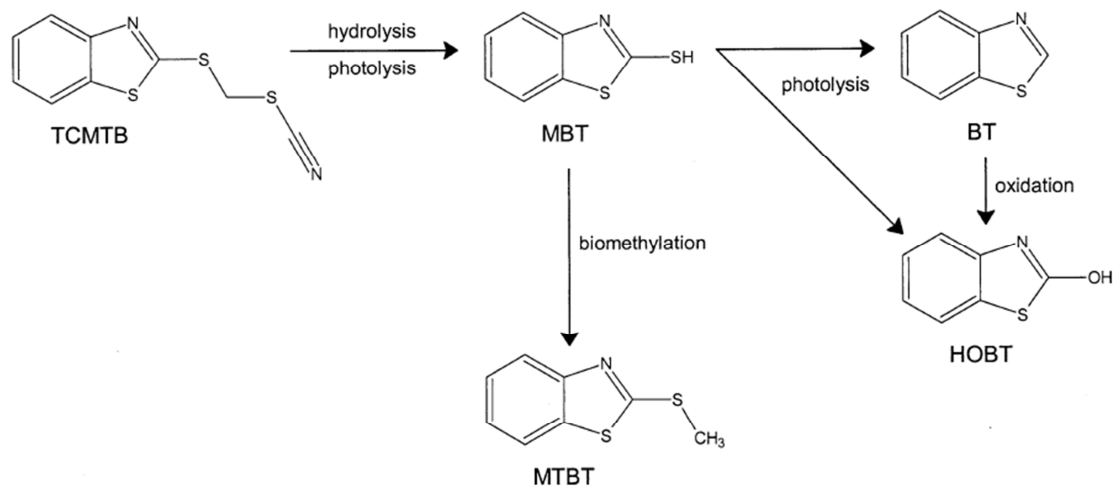


Figura 11.1. Degradació proposada i passos de transformació del TCMTB en el medi ambient aquàtic (adaptat de Brownlee et al. 1992). (Nawrocki S.T. 2005)

La major toxicitat la presenta el bany d'adobament vegetal on s'ha afegit TCMTB. A la toxicitat de la molècula se li ha de sumar la toxicitat produïda pels productes orgànics residuals, que fan augmentar aquest valor.

Els dos fungicides proposats com alternatius presenten una toxicitat molt més baixa en tots tres casos. Es destaca el resultat de la toxicitat produïda pel bany amb IPBC, ja que tant per la pell adobada al crom com la pell adobada amb extractes vegetals és igual a la que presenta el bany sense fungicida afegit.

6. Viabilitat econòmica

La decisió d'utilitzar o no un fungicida alternatiu als habituals depèn principalment de l'eficàcia del producte. Si l'antifúngic escollit reuneix les característiques necessàries per aplicar-lo en la indústria, caldrà valorar si també és acceptable econòmicament.

La viabilitat econòmica dels dos productes alternatius que millor resultat han donat (DIMPTS i IPBC) es compara amb els dos fungicides convencionals (TCMTB i mescla de fenòlics), amb les formulacions comercials utilitzades.

La Taula 11.6 mostra els productes utilitzats al llarg de la tesi, junt amb el proveïdor dels mateixos. El TCMTB i la barreja de PCMC i OPP són productes habituals en el sector i els preus que ofereixen actualment són molt competitius.

FUNGICIDA	NOM COMERCIAL	DISTRIBUÏDOR
TCMTB (30% riquesa)	Mirecide TC/61.AR	LAMIRSA
PCMC + OPP (42% riquesa)	Preventol WB-L	LANXESS
DIMPTS (40% riquesa)	Amical Flowable	DOW
IPBC (40% riquesa)	BIOBAN IPBC 40LE	DOW
IPBC (30% riquesa)	PREVENTOL MP260	LANXESS

Taula 11.6. Producte i proveïdor dels fungicides escollits

Tant el DIMPTS com el IPBC són dues molècules de nova aplicació en Europa. La poca informació sobre els bons resultats d'aquests productes fa que el mercat sigui escàs o nul en la Comunitat Europea, i per tant, en la compra d'aquests productes s'hauria d'afegir la despesa que comportaria posar en marxa la producció, fet que encareix el preu. Converses amb els principals responsables comercials de DOW i de LANXESS afirmen que són productes utilitzats fora de la Unió Europea amb resultats excel·lents, però que la poca demanda a Espanya fa que actualment no disposin d'un preu prou competitiu. (Dow i Lanxess, setembre 2013)

Es coneix però, que en mercats on ja hi ha comercialització del IPBC el seu preu és competitiu. Al centre i sud d'Amèrica el preu d'aquest producte és del mateix ordre de magnitud que el TCMTB, i es troba dins el rang de preus dels fungicides utilitzats en el sector (New Blue, setembre 2013).

7. Conclusions

En els tres tipus de processos estudiats, la major toxicitat és la causada per la molècula del TCMTB. Aquesta toxicitat pot variar entre 20 vegades (en adobament al crom) i 40 vegades la toxicitat del bany de referència (en greixatge de pell vegetal). En el píquel de conservació, la diferència entre la toxicitat del TCMTB i la del bany de referència es dispara. El pH àcid del bany estabilitza la molècula, i la toxicitat determinada supera fins a 1000 vegades la del bany de referència. Quan el pH de les aigües residuals s'acosta 7, la toxicitat d'aquest compost disminueix, i per tant, en les plantes de tractament d'aigües la toxicitat és molt menor.

Per adobament amb crom, la toxicitat dels banys amb la barreja de compostos fenòlics és 4 vegades la de referència, la del bany amb DIMPTS és 6 vegades la de referència i la del bany amb TBZ només 2.5 vegades, destacant que la utilització de IPBC no addiciona més toxicitat a la que ja es determina en el bany de referència.

En el píquel de conservació, el DIMPTS presenta una toxicitat 7 vegades superior a la toxicitat de referència i en el greixatge vegetal, la toxicitat d'aquesta molècula és pràcticament la mateixa que causa un bany sense fungicida afegit (1.3 vegades). Es coneix que el DIMPTS és estable a pH 5, però s'hidrolitza i es degrada a pH 7 i 9 per formar monoïode-p-tolilsulfona amb vides mitjanes que van des 1.5 a 9.6 dies. (EPA 2008)

És important destacar que la toxicitat del IPBC en els dos tipus d'adobament (al crom i greixatge de pell vegetal) és la mateixa que en el procés on no s'hi ha afegit fungicida. En el píquel de conservació és 5 vegades superior que la referència. Assajos previs de laboratori indiquen que el IPBC pateix una ràpida hidròlisis a pH 9, però és estable a pH 5. És absorbit moderadament per diversos tipus de sòl i es degrada ràpidament sota condicions aeròbiques. (Henderson 1992) És important destacar que diversos estudis indiquen que el IPBC no és cancerigen, mutagènic ni teratogènic.

CAPÍTOL 12

DIFUSIÓ DELS RESULTATS

Els resultats obtinguts al llarg de la investigació han estat difosos en els següents articles de revistes internacionals:

- Cuadros S., Manresa M., Font J., Bautista ME., Maldonado F., Marsal A.; “*Alternative Fungicides: comparative study with conventional chemicals*”; Journal of Society of Leather Technologists and Chemists (JSLTC); vol. 95-6, p. 263-269, nov-dic. 2011
- Font J., Reyes M., Cuadros S., Bacardit A., Marsal A.; “*Determination of TCMTB and Other Fungicides in Leather*”; Journal of the American Leather Chemists Association (JALCA); vol. 106 (may 2011) p. 341-348
- Cuadros S., Manresa M., Font J., Bautista ME., Puig R., Marsal A.; “*Alternative Fungicides for the leather Industry: Application in diferent processes*”; Journal of Society of Leather Technologists and Chemists (JSLTC); vol. 96-6 (nov-dic. 2012); p. 225-233

La participació en diferents Congressos també ha estat important, tant a nivell nacional com internacional:

- Cuadros S., Manresa M., Font J., Bautista ME., Maldonado F., Marsal A.; “*Alternative Fungicides for leather Industry: Part I*”; XXXI Congrès Internacional IULTCS (International Union of Leather Technologists and Chemists Societies), València, 27-30 setembre 2011
- Cuadros S., Manresa M., Font J., Bautista ME., Puig R., Marsal A.; “*Fungicidas Alternativos para la Industria de Curtidos. Aplicación en Diferentes Procesos*”; 61º Congrès Nacional d'AQEIC (Asociación Química Española de la Industria del Cuero); Igualada, maig 2012
- Cuadros S., Manresa M., Font J., Marsal A., Ollé Ll.; “*Fungicidas Alternativos para la Industria de la Piel: DIMPTS e IPBC*”; 62º Congrès Nacional d'AQEIC; Lorca, maig 2013

- Cuadros S., Manresa M., Font J., Bautista ME., Maldonado F., Marsal A.; *“Alternative Fungicides for the Leather Industry: Application in Wet Blue and Vegetal Leather”*; XXXII Congrés Internacional IULTCS, Istanbul (Turkey), 28-31 maig 2013

En l'Annex G s'inclou una còpia de cadascun dels articles i de les presentacions esmentades.

CAPÍTOL 13

CONCLUSIONS FINALS

Dos dels quatre fungicides proposats com alternatius demostren una eficàcia major que els productes usats en la pràctica actual en el sector de la pell, tant per les soques obtingudes de la *Colección Española de Cultivos Tipo*, CECT, com per les soques aïllades de fàbriques adoberes.

La determinació de la Concentració Mínima d'Inhibició (CMI) dels fungicides estudiats en aquest treball confirma que tres dels quatre fungicides proposats com alternatius, el diiodometil-p-tolilsulfona (DIMPTS), el 3-iodo-2-propinil-N-butilcarbamat (IPBC) i el tiabendazol (TBZ) presenten una CMI més baixa que els fungicides convencionals 2-(tiocianometiltio)-1,3-benzotiazol (TCMTB) i la barreja de compostos fenòlics (p-cloro-m-cresol, PCMC, i o-fenilfenol, OPP) enfront les soques adquirides de la CECT. Davant les soques aïllades d'adoberies, el DIMPTS i el IPBC presenten una CMI molt menor que la resta. La sal sòdica de dodecil-di(aminoetil)-glicina (TEGO) s'ha descartat per estudis posteriors degut a l'elevada CMI que presenta. La resta proporcionen una CMI acceptable davant les soques assajades.

Els dos fungicides utilitzats convencionalment, el TCMTB i la barreja de fenòlics (PCMC i OPP) presenten una CMI més elevada pels tres fongs aïllats. Aquestes tres soques són espècies que han sobreviscut en fàbriques adoberes, a processos tractats amb aquests productes, per tant poden posseir una resistència adquirida a les molècules.

Dels dos fungicides utilitzats convencionalment en les adoberies i que s'han estudiat en aquesta tesi, el TCMTB aplicat directament sobre la pell wet blue mostra una capacitat antifúngica més elevada davant els fongs escollits. Tot i que un 0.2% de TCMTB és suficient per evitar el creixement de l'*Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088) en placa, aquesta concentració no és efectiva contra el *Trichoderma harzianum* (CECT 2423). Per altra banda, se'n necessita més d'un 0.2% de la barreja de compostos fenòlics per evitar la invasió de la pell per part dels dos fongs testats.

Aplicant els antifúngics directament sobre les mostres de pell wet blue, la mínima concentració ofertada (un 0.1%) de dos dels tres fungicides alternatius (DIMPTS i IPBC) confereixen una protecció satisfactòria enfront el creixement de l'*A.brasiliensis* i el *T.harzianum*. Pel que fa al TBZ,

la formulació comercial provada resulta ineficient pels fong seleccionats, almenys en les ofertes més baixes de producte assajades (0.1 - 0.2 - 0.5%).

Aplicant el producte en un adobament al crom en bombos de laboratori, la gran capacitat antifúngica del DIMPTS i del IPBC confirmen que són aptes per la seva utilització en aquest procés de la producció de pell. Un 0.2% d'aquests dos productes sobre pes de pell tripa prevé l'atac de la pell per part dels fongs utilitzats en l'estudi i a més, projecta una elevada zona d'inhibició al voltant de les mostres. A aquesta dosis, els fungicides convencionals (TCMTB i fenòlics) i el TBZ només protegeixen la pell davant d'una de les cinc soques escollides (*Aspergillus brasiliensis* (CECT 2088)).

El fet d'utilitzar el DIMPTS i el IPBC en un adobament al crom en planta pilot i continuar el procés fins a la tintura i l'engreix no afecta negativament al tacte ni a la fermesa del cuir obtingut. La presència de qualsevol dels dos fungicides alternatius no influeix en la igualació de la tintura al llarg de tota la mostra, si més no, amb un colorant d'origen vegetal, com l'utilitzat en aquesta pràctica.

Els assajos realitzats a les dues mostres de pell tenyida i greixada, obtingudes de dos processos paral·lels en planta pilot on s'han utilitzat el DIMPTS i el IPBC confirmen que el fet d'utilitzar aquests dos fungicides diferents als habituals no perjudica les prestacions funcionals de les pells, com les resistències ni les solideses.

En un píquel de conservació segueixen produint millor resposta els fungicides DIMPTS i IPBC respecte el TCMTB. Tot i que un 0.11% dels tres fungicides utilitzats no és suficient per evitar el creixement de soques a la pell, en el cas del DIMPTS i del IPBC, si que evita que la pell quedi completament contaminada, cosa que no passa amb el TCMTB.

Les pells piquelades emmagatzemades durant tres mesos en condicions similars a les de fàbrica poden resistir els atacs d'aquests microorganismes durant aquest període amb un 0.15% de TCMTB, DIMPTS o IPBC, a més de mantenir la pell en perfectes condicions. El contingut de fungicida a la pell disminueix amb el temps. Per això, si es realitza un píquel de conservació, i la pell resta emmagatzemada durant un llarg període, és important afegir més quantitat de fungicida en alguns dels processos posteriors, com pot ser un adobament al crom o un greixatge de pell vegetal.

Les quantitats de fungicida aplicades en un greixatge de pell adobada al vegetal són molt inferiors a les quantitats afegides en els altres processos estudiats (adobament al crom o píquel) degut a que el temps d'emmagatzematge d'aquest tipus de producte és molt inferior. Un 0.05% dels dos fungicides alternatius (DIMPTS i IPBC) és suficient per evitar la contaminació de les mostres en aquest estat. En canvi, un 0.05% de TCMTB no resulta efectiu davant de cap de les cinc soques assajades. A més, el fet d'aplicar qualsevol dels fungicides proposats no afecta al cuir resultant. L'aspecte i el tacte esdevenen sense imperfeccions ni taques.

Un 0.2% és una quantitat utilitzada normalment per aplicar en adobament al crom, però s'ha demostrat que percentatges menors (entre 0.12% i 0.16%) de DIMPTS i IPBC evitarien l'atac de *A.brasilensis*, el *T.harzianum* i el *P.spinulosum*. En un píquel de conservació, un 0.16% tant de DIMPTS com de IPBC asseguren la protecció de la pell enfront les tres soques escollides, encara que quantitats inferiors de IPCB (0.04%) poden protegir la pell de *A.brasilensis*. En el cas de la pell vegetal, per conservar-la en perfecte estat durant quatre setmanes, seria necessari un percentatge d'entre 0.04% i 0.08% de DIMPTS. En canvi, un 0.02% de IPBC confereix una protecció adequada de la pell durant un mes davant *A.brasilensis* i el *P.spinulosum*. És interessant destacar que els diferents tipus de fongs requereixen diferents quantitats de fungicida, tal i com s'observa en els resultats de la CMI.

Respecte a la distribució estratigràfica de fungicida a la pell, existeix diferència entre el repartiment dels fungicides dins la pell wet blue i dins la pell greixada vegetal. Un mateix antifúngic es distribueix de manera molt diferent a les capes de cada tipus de pell analitzada. Per la pell wet blue, la major quantitat de fungicida (excepte en el cas del TBZ) es troba a la capa flor (60-70%), seguit per la capa carn (25-30%), sent resultats que concorden amb la bibliografia. En canvi, per a la pell vegetal, les dues capes externes contenen la mateixa quantitat de producte aproximadament (entre un 35-50%), deixant una menor quantitat a la capa intermitja. Les diferències que existeixen entre aquests dos tipus d'adobament i les característiques de la pell obtinguda poden ser la causa d'aquesta diferència.

En els tres tipus de processos estudiats, la major toxicitat és la causada per la molècula del TCMTB. Aquesta toxicitat pot variar entre 20 vegades (en adobament al crom) i 40 vegades (en greixatge de pell vegetal) la toxicitat del bany de referència. En el píquel de conservació, la diferència entre la toxicitat del TCMTB i la del bany de referència és molt més elevada (fins a 1000 vegades). La toxicitat del DIMPTS en els diferents processos oscil·la entre 1.3 i 7 vegades la toxicitat del bany sense fungicida. El IPBC és el que menor toxicitat provoca, coincidint amb el

que major poder antifúngic posseeix. En els dos tipus d'adobament el IPBC causa la mateixa toxicitat que en un bany sense fungicida afegit.

Aquesta toxicitat és la determinada en el pH de procés. Totes tres molècules són estables a pH 5, degradant-se lentament a mesura que el pH s'acosta a 7 i accelerant la reacció d'hidròlisis quan el pH està al voltant de 9. Tot i que les molècules es degraden en arribar a pH's propers al de les plantes depuradores, l'elevada diferència que hi ha entre la toxicitat produïda pel TCMTB i la de les molècules alternatives seguirà causant divergències entre les aigües residuals d'uns i altres processos.

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

Agència Catalana de l'Aigua; ACA-GENCAT [Consulta: juliol 2013]. Disponible a <http://aca-web.gencat.cat/aca/>

Adam, actualitzat al maig de 2011 [en línia]: [Consulta: juny 2013]. Disponible a <http://www.clinicadam.com>

Adminis U., Huynh C., Money C.A.; "*The need for improved fungicides for wet-blue*"; CSIRO Textile and Fibre Technology; XXVI IULTCS Congress; març 2001

Adzet, J. M. et al. *Química Tècnica de Tenerife*. Igualada: Romanyà Valls, 1985. ISBN. 843983375-X

Adzet, J. M^a et al. *Tecnología del Cuero*. Vol. 4. Igualada: Ediciones Ciceró S.L, 1995. B. 37.809-1995.

Allué, Josep M., et al. *El Museu De La Pell d'Igualada*. Terrassa: Museu de la Pell d'Igualada i Comarcal de l'Anoia, 2002. ISBN. 8439356498.

Amanda Bugby; "*The practical evaluation of fungicides*"; Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists (JSLTC); vol. 71, p. 138-141

Andrews J.M.; "*Determination of minimum inhibitory concentrations*"; Journal of Antimicrobial Chemotherapy 48, Suppl. S1, 2001; p.5-16

ASTM D 4576-01; "*Standard Test Method for Mold Growth Resistance of Wet Blue*"

Bacardit, A.; Ollé, L. *El acabado del cuero*. Igualada: Escola Universitària d'Enginyeria Tècnica – Escola Superior d'Adoberia, 2007. ISBN. 8493183717.

Bacardit, A.; Ollé, L. *Maquinaria de curtidos*. Igualada: Escola Universitària d'Enginyeria Tècnica – Escola Superior d'Adoberia, 2002. ISBN. 8493183741.

Bayramoglu E.E.; *"Ecological and Innovative Fungicide for the Leather Industry: Essential Oil of Origanum Multiflorum"*; Journal of the American Leather Chemists Association, JALCA 101(3), 2006; p. 96-104

Binnur Meriçli Yapici, Ismail Karaboz; *"The effect of two anti-fungal compounds on the growth of molds that frequently appear on tanned leather"*; JALCA, vol. 92, 1997; p. 38-45

Brownlee B.G., Carey J.H., MacInnis G.A., Pellizzari I.T.; *"Aquatic environmental chemistry of 2-(thiocyanomethylthio)benzothiazole and related benzothiazoles"*. Environmental Toxicology Chemists 11, 1992; p. 1153-1168

M.R; Aqueous Hydrolysis of P-100. EPL Bio-Analytical Services, Inc. Laboratory Project number 147-001. Submitted to: Troy Chemical Corporation: Newark NJ; october 29, 1990

CECT – *Colección Española de Cultivos Tipo*; Parc Científic Universitat de València; Catedrático Agustín Escardino, 9; 46980 Paterna (Valencia); telf: 96 354 46 12 / Fax: 96 354 31 87.
(<http://www.cect.org/>)

Cuadros S., Manresa M., Font J., Bautista ME., Maldonado F., Marsal A.; *"Alternative Fungicides: comparative study with conventional chemicals"*; Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists (JSLTC); vol. 95-6, nov-dic. 2011; p. 263-269

Cuadros S., Manresa M., Font J., Bautista ME., Maldonado F., Marsal A.; *"Alternative Fungicides: comparative study with conventional chemicals"*, Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists (JSLTC); vol. 95-6, nov-dec. 2011; p. 263-269

Cuadros S., Manresa M., Font J., Bautista ME., Puig R., Marsal A.; *"Alternative Fungicides for the leather industry: application in different processes"*, Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists (JSLTC) vol. 96-6, nov-dec. 2012; p. 225-233

Dalton D.L.; *"New generation fungicide for the leather industry"*; Leather; ag-set. 2008; p.48-52

Datacolor [en línia]: [Consulta: juny 2013]. Disponible a <http://industrial.datacolor.com/>

Deacon, J.W; *Introducción a la micología moderna*; Ed. Limusa; 1990; ISBN 6981826418

"Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) = 2000 Copyright by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI, 6, p. 509-515

Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de febrero de 1998; Official Journal of the European Communities de 24 de abril de 1998; p. L123/1 – L123/63

DOW Chemicals; Comunicació privada amb Rafael Bonmatí, Product Manager de Brenntag Química, S.A.U. C/ Gutenberg 22, Pol. Ind. El Lomo, 28906 Getafe (Madrid), Espanya; telf. 91 665 30 00; mòbil. 609 51 29 33; Fax. 91 665 30 13; e-mail: rafael.bonmati@brenntag.es; <http://www.brenntag.es>; setembre 2013

EPA; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (WASHINGTON, D.C. 20460); *"Reregistration Eligibility Decision for 3-Iodo-2-propynylbutylcarbamate (IPBC)"*; Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7508W); EPA 738-F-97-003; Març 1997

EPA; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (WASHINGTON, D.C. 20460); *"Reregistration Eligibility Decision for 2-(Thiocyanomethylthio)- benzothiazole (TCMTB)"*; Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7510P); EPA 739-R-05-003; Agost 2006

EPA; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (WASHINGTON, D.C. 20460); *"Reregistration Eligibility Decision for Diiodomethyl p-tolyl sulfone"*; Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7510P); EPA 739-R-08-002; Març 2008

Font J.; *Análisis y ensayos en la industria del curtido*. CETI, Consorci Escola Tècnica d'Igualada, 2002, ISBN 849318375-X

Font J., Reyes M., Cuadros S., Bacardit A., Marsal A.; *"Determination of TCMTB and Other Fungicides in Leather"*; Journal of the American Leather Chemists Association (JALCA); vol. 106, may 2011; p. 341-348

Galloway; *"Fungicides for treating wet blue hides"*; Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists (JSLTC); vol. 58, 1974; p. 67

H.W. Hanssen, N.D. Henderson & J.E.H Ward; *"A review of the environmental impact and toxic effects of TCMTB"*; Environmental Protection Division; B.C. Environment; British Columbia; octubre 1991

Hauber, C.; *"Microbicide applications in the leather industry"*, En: Paulus, W. (Ed), Directory of microbicides for the protection of materials, Springer, Berlin, 2005; p. 317-324

Hauber, C., Germann H.P.; *"The addition of fungicides in chrome tannage and their penetration absorption and distribution in the wet-blue"*; World leather, may 1997; p.75-82.

Hauber C.; *"Fungicides"*; Leather International, 16 agost 2008; [en línia] [Consulta: 2011-12] Disponible a; <http://www.leathermag.com/>

Hauber C. and German H.P.; *"The mixtures of wet-white pre-tanning systems to mould growth when appeared by various fungicides"*. World Leather; 2006; p. 31-32

Henderson N.D; *"A review of the environmental impact and toxic effects of IPBC"*; BC Environment; Ministry of environment, Lands and Parks, Victoria, Bristish Columbia; June 1992; ISBN 0772616132

Inoxvic [en línia]: [Consulta: juny 2013]. Disponible a <http://www.inoxvic.com/>

ISO 13365; Leather – Chemical Tests – *"Determination of the preservative (TCMTB, CMK, OPP, OIT) content in leather"*

IUP 3; *"Acondicionamiento"*; ISO 2419; JSLTC 84, p. 241; 2000 (AQEIC, oct.2001)

IUP 4; *"Medición del espesor"*; ISO 2589; JSLTC 84, p. 311, 2000 (AQEIC, oct.2001)

IUP 6; *"Medición de la resistencia a la tracción, porcentaje de elongación a una carga determinada y a la rotura"*; ISO 3376; JSLTC 84, p. 317, 2000 (AQEIC, oct.2001)

IUP 8; *"Medición de la resistencia al desgarró"*; ISO 3377; JSLTC 84, p. 327, 2000 (AQEIC, oct.2001)

IUP 9; “*Medición de la distensión y resistencia de la flor en el ensayo del estallido (lastómetro)*”; ISO 3379; JSLTC 44, p. 371, 1960 (AQEIC 12, 1961)

IUF 120; “*Reglas básicas para la realización de los ensayos*”; ISO 105-A01; JSLTC 50, p. 287, 1966 (AQEIC 26, p.226, 1975)

IUF 131; “*Escala de grises para la valoración del cambio de color del cuero*”; ISO 105-A02, ISO 105-A05; JSLTC 50, p. 293, 1966 (AQEIC 26, p.233, 1975)

IUF 401; “*Solidez a la luz del color del cuero; luz diurna*”; ISO 105-B01; JSLTC 56, p. 383, 1972 (AQEIC 26, p.255, 1975)

IUF 420; “*Solidez del cuero a la gota de agua*”; ISO 15700-98; JSLTC 59, p. 99, 1975 (AQEIC 29, p.209, 1978)

IUF 450; “*Solidez del color del cuero al frote*”; ISO 11640-93; JSLTC 71, p. 24, 1987 (AQEIC 26, p.282, 1975)

IULTCS International Union of Leather Technologists and Chemists Societies [en línia]: [Consulta: 2012-13]. Disponible a <http://www.iultcs.org>

Kennedy L.W.; “*More information about fungicides*”; 50th LASRA Conference; 2004

Labortecnic. Equipos, servicios e instalaciones para la industria química farmacéutica [en línia]: [Consulta: juny 2013]. Disponible a <http://www.labortecnic.com>

LANXESS; Comunicació privada amb Carmen Carmona; LANXESS Chemicals, S.L.; Responsable Tècnic Comercial, Material Protection Products, Moll de Barcelona, sn, World Trade Center, Edifici Nord, 7^a planta, E 08039 Barcelona, Espanya; Tel.: 93 341 52 00; Mòb.: 648 064 740; Fax.: 93 341 52 91; e-mail: web: <http://www.lanxess.com>; setembre de 2013

Leica microsystems [en línia]: [Consulta: juliol 2013]. Disponible a <http://www.leica-microsystems.com/>

Meding B, Toren K, Karlberg A-T, Hagberg S, Wass K; *Evaluation of skin symptoms among workers at a Swedish paper mill*; 1993; Am J Ind Med 23; p.721-728

Morera J.M., *Química Técnica de Curtición*. CETI, Consorci Escola Tècnica d'Igualada, 2002; ISBN 8493183709

Muntañola M.; *Guia dels fongs microscòpics*; ed. Pòrtic Natura, 1997, ISBN 8473069358

Nawrocki S.T.; Drake K. D.; Watson G. D.; Foster K. J.; Maier; *Comparative Aquatic Toxicity Evaluation of 2-(Thiocyanomethylthio)benzothiazole and Selected Degradation Products Using Ceriodaphnia dubia*; Arch. Environmental Contam. Toxicol. 48; 2005; p. 344-350

NEW BLUE; Comunicació privada amb Eduardo Campos Nava, director tècnic de l'adoberia New Blue de Leon (Mèxic), i director general de l'empresa de productes químics per adoberia Technical Supplier SA, setembre de 2013.

Onorati F. et al.; "*Determinants and prognosis of myocardial damage after coronary artery bypass grafting*"; The annals of thoracic surgery 2005, 79; 837-845

Orlita, A.; "*Microbial biodeterioration of leather and its control: a review*"; International Biodeterioration and Biodegradation; 53, 2004; p. 157-163

Padoan, K.; "*New generation of fungicides for leather preservation*"; Proceedings del II Eurocongress of the International Union of Leather Technologists and Chemists Societies (IULTCS), maig 2006, Estambul

Paulus; *Directory of Microbicides for the Protection of Materials*; Wilfried (ed.), 2005; ISBN 9781402028175

Perkin Elmer [en línia]: [Consulta: juny 2013]. Disponible a <http://www.perkinelmer.com/>

Reyes Ferrera, M.R.; "*Determinació de fungicides en pells i en mostres aquoses per cromatografia líquida d'alta resolució amb detector de fotodíodes (HPLC-PDA)*". Treball de fi de Màster d'enginyeria del Cuir; Igualada, febrer 2011

Russel, Pinchuck and Cooper; *"Fungicide Evaluation for the protection of wet blue hides"*; Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists (JSLTC), vol. 69, 1985; p. 135-140

Seguer, J., Beltrán, M^a T.; *"Productos biocidas notificados en la Directiva 98/8/CE en el sector de curtición"*; Proceedings 52^o Congreso AQEIC, Lorca, abril 2003, p. 37-47

Seguer J., Beltrán M., Rodriguez F.J., Ballester J., González M^a C., Fernández T.; *"Disminución de la toxicidad de las aguas residuales de un proceso de curtición en el que se ha utilizado TCMTB como protector de las pieles"*; Proceedings 51 Congreso AQEIC, Tortosa, abril 2002; p.101-109

Selecta, laboratory equipment manufacturer [en línia]: [Consulta: maig 2013]. Disponible a <http://www.grupo-selecta.com/>

Skoog, Douglas A., Holler, James F., Nieman, Timothy A.. *Principios de Análisi Instrumental*. Madrid: Ed. McGraw Hill, 5^a edición, 2010. ISBN. 8448127757

Soler, J. *Procesos de curtidos*. Igualada: Escola Universitària d'Enginyeria Tècnica – Escola Superior d'Adoberia, 2000; ISBN 84183725

Suntest Atlas [en línia]: [Consulta: juny 2013]. Disponible a <http://www.atlas-mts.es/>

UNE EN ISO 11348-3:2009; Calidad del agua. *"Determinación del efecto inhibidor de muestras de agua sobre la luminiscencia de Vidrio fischeri (ensayo de bacterias luminiscentes). Parte 3; Método utilizando bacterias liofilizadas"*

UPC Universitat Politècnica de Catalunya [en línia]: [Consulta: juny 2013]. Disponible a <http://www.upc.edu>

Van Deren J.; Weiss E.F.; *"Controlling Fungal Growth on leather: correlation of TCMTB uptake and duration of mold resistance"*; Buckman laboratories; JALCA, 1978; vol.73

Waters [en línia]: [Consulta: maig-juny 2013]. Disponible a <http://www.waters.com/>

Wiley Mill [en línia]: [Consulta: agost 2013]. Disponible a <http://www.thomasci.com/wileymill/>

ÍNDIX DE TAULES

<i>Taula 2.1. Fungicides més importants i més coneguts utilitzats en la indústria de la pell (Adminis et al. 2001, Hauber 2008)</i>	29
<i>Taula 2.2. Compostos fungicides seleccionats per fer l'estudi</i>	31
<i>Taula 3.1. Estructura molecular dels fungicides utilitzats</i>	36
<i>Taula 3.2. Grup al que pertanyen els fungicides seleccionats dins la Directiva 98/8/CE i mode d'acció</i>	37
<i>Taula 3.3. Nom i número de la "Colección Española de Cultivos Tipo" dels fongs utilitzats</i>	38
<i>Taula 3.4. Dades cromatogràfiques del mètode utilitzat per la determinació de fungicides en pell</i>	51
<i>Taula 4.1. Nom de les espècies de fongs aïllades i identificades.</i>	57
<i>Taula 5.1. Fungicides als que se'ls ha determinat la CMI</i>	59
<i>Taula 5.2. Relació de fongs utilitzats per determinar la CMI dels productes</i>	60
<i>Taula 5.3. Preparació de les dilucions per determinar la CMI d'un agent antimicrobià</i>	61
<i>Taula 5.4. Esquema per a la preparació de les dilucions d'antifúngic.</i>	62
<i>Taula 5.5. Plantilla pel registre dels resultats de la CMI</i>	64
<i>Taula 5.6. Resultats de la CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$) enfront els fongs adquirits de la CECT</i>	65
<i>Taula 5.7. Resultats de la CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$) amb els fongs aïllats de fàbrica</i>	66
<i>Taula 6.1. Fungicides utilitzats en l'estudi del Capítol 6</i>	71
<i>Taula 6.2. Nom i número de col·lecció dels fongs utilitzats en l'estudi del Capítol 6</i>	71
<i>Taula 6.3. Adobat al crom de pells piquelades, sense fungicida. Ofertes sobre pes de pell piquelada</i>	72
<i>Taula 6.4. Resultats del percentatge del Creixement en Superfície (CS) per fongs i de la Zona d'Inhibició (ZI) observada en mostres amb diferents ofertes de fungicida, després de 90 dies d'incubació.</i>	74
<i>Taula 6.5. Mitjana de la superfície de pell recoberta per l'<i>Aspergillus brasiliensis</i> (CECT 2088) en el transcurs de les setmanes</i>	79

<i>Taula 6.6. Mitjana de la superfície de pell recoberta pel <i>Trichoderma harzianum</i> (CECT 2423) en el transcurs de les setmanes</i>	80
<i>Taula 7.1. Fungicides utilitzats en l'estudi del Capítol 7(I)</i>	83
<i>Taula 7.2. Nom i número de col·lecció dels fongs utilitzats en l'estudi del Capítol 7(I)</i>	83
<i>Taula 7.3. Adobament al crom (% sobre pes de pell tripa)</i>	84
<i>Taula 7.4. Fórmula de l'adobament al crom de la pell amb diferents quantitats de fungicida. (% sobre pes de pell piquelada)</i>	85
<i>Tabla 7.5. Diferents quantitats de fungicida afegit en l'adobament al crom</i>	86
<i>Taula 7.6. Nom i número de col·lecció dels fongs utilitzats a l'apartat 4.2, del Capítol 7(I)</i>	86
<i>Taula 7.7. Resultats de Creixement en Superfície (CS – expressat en %) i zona d'inhibició (ZI – expressat en mm) per les mostres de pell wet blue, als 90 dies de control</i>	87
<i>Taula 7.8. Resultats de Creixement en Superfície (CS) i Zona d'Inhibició (ZI) per les mostres de pell wet blue, amb diferents quantitats de fungicida (DIMTPS i IPBC), passats 90 dies de control.</i>	92
<i>Taula 7.9. Equivalència aproximada entre els percentatges calculats sobre pes de pell píquel i sobre pes de pell tripa per la pell utilitzada.</i>	94
<i>Taula 7.10. Fungicides utilitzats en l'estudi del Capítol 7(II)</i>	96
<i>Taula 7.11. Nom i número de col·lecció dels fongs utilitzats</i>	97
<i>Taula 7.12. Productes aplicats en el re-píquel (pesos calculats sobre 7.5kg de pell a cada bombo)</i>	97
<i>Taula 7.13. Recepta de l'adobament al crom (% sobre pes de pell piquelada)</i>	98
<i>Taula 7.14. Fórmula seguida des del rentat posterior a l'adobament fins a l'engreix (% sobre pes de pell rebaixada)</i>	99
<i>Taula 7.15. Tests físics realitzats a la pell en crust (Font 2002)</i>	101
<i>Taula 7.16. Mitjana dels resultats de Creixement en Superfície CS (%) i de la Zona d'Inhibició - ZI (mm), després de 90 dies de control</i>	105
<i>Taula 7.17. Mitjana i desviació estàndard de les 10 mesures pel cuir amb DIMPTS i amb IPBC</i>	109
<i>Taula 7.18. Resultats de la resistència a l'esquinçament per la pell amb DIMPTS i per la pell amb IPBC</i>	111
<i>Taula 7.19. Resultats de la resistència a la tracció per la pell amb DIMPTS i per la pell amb IPBC</i>	112

<i>Taula 7.20. Resultats del % d'elongació per la pell amb DIMPTS i per la pell amb IPBC</i>	113
<i>Taula 7.21. Resultats de la ruptura de flor per la pell amb DIMPTS i per la pell amb IPBC</i>	113
<i>Taula 7.22. Distribució de fungicida a les diferents capes de pell adobada en planta pilot</i>	114
<i>Taula 8.1. Fungicides utilitzats en l'estudi del píquel de conservació</i>	118
<i>Taula 8.2. Nom i número de col·lecció dels fongs utilitzats</i>	118
<i>Taula 8.3. Primera part de píquel, realitzada a fàbrica (% sobre pell tripa)</i>	118
<i>Taula 8.4. Fórmula de píquel de conservació (% sobre pes de pell semi-piquelada)</i>	119
<i>Taula 8.5. Fórmula del píquel de conservació (% sobre pes de pell semi-piquelada)</i>	120
<i>Taula 8.6. Diferents quantitats de fungicida afegit en el píquel de conservació</i>	120
<i>Taula 8.7. Nom i número de col·lecció dels fongs utilitzats en aquest apartat</i>	121
<i>Taula 8.8. Recepta del píquel de conservació aplicat per emmagatzemar les pells (% sobre pes de pell semi-piquelada)</i>	121
<i>Taula 8.9. Adobament del crom de les pells piquelades, emmagatzemades durant 3 mesos.</i>	122
<i>Taula 8.10. De la neutralització a l'engreix (% sobre pes de pell adobada al crom)</i>	123
<i>Tabla 8.11. Resultats de Creixement en Superfície (CS) i de Zona d'Inhibició (ZI) observats en les diferents mostres de pell piquelada, després de 90 dies de control.</i>	124
<i>Taula 8.12. Resultats de Creixement en Superfície (CS) i de Zona d'Inhibició (ZI) observats en les diferents mostres de pell piquelada, transcorreguts 90 dies de control</i>	128
<i>Taula 8.13. Contingut de fungicida a les pells, després de piquelar (1), després d'emmagatzemar (2) i després de seguir el procés fins l'engreix (3)</i>	131
<i>Taula 9.1. Fungicides utilitzats en l'estudi de la protecció de pell vegetal</i>	134
<i>Taula 9.2. Nom i número de col·lecció dels fongs utilitzats</i>	134
<i>Taula 9.3. Greixatge de pell vegetal (% sobre pes de pell adobada al vegetal)</i>	135
<i>Tabla 9.4. Fórmula del procés d'adobament vegetal (% sobre pes piquelada)</i>	136
<i>Tabla 9.5. Fórmula del procés de greixatge de la pell vegetal (% sobre pes de pell adobada i escorreguda)</i>	137
<i>Tabla 9.6. Diferents quantitats de fungicida afegit en el greixatge de pell vegetal</i>	137

<i>Taula 9.7. Nom i número de col·lecció dels fongs utilitzats en aquest apartat</i>	137
<i>Tabla 9.8. Resultats de Creixement en superfície (CS) i de Zona d'inhibició (ZI) observats a les diferents mostres de pell vegetal, transcorreguts 20 dies de control.</i>	138
<i>Taula 9.9. Contingut de fungicida a la pell vegetal, resultant de la part experimental de l'apartat 4.1.</i>	141
<i>Tabla 9.10. Resultats de Creixement en Superfície (CS) i Zona d'Inhibició (ZI) per les mostres vegetals, amb diferents quantitats de fungicida (DIMPTS i IPBC), passats 30 dies de control</i>	142
<i>Taula 10.1. Fungicides utilitzats en la determinació estratigràfica de fungicida</i>	146
<i>Taula 10.2. Continuació formulació adobat de pells vegetals (% sobre pes de pell semi-abodada)</i>	147
<i>Taula 10.3. Greixatge de la pell adobada al vegetal (% sobre pes de pell escorreguda)</i>	148
<i>Taula 10.4. Percentatge total de fungicida (%) present a cada capa de pell wet blue</i>	150
<i>Taula 10.5. Percentatge de fungicida (%) present a cada capa de pell vegetal</i>	151
<i>Taula 10.6. Percentatge total de fungicida (%) contingut en cada capa de pell en els dos tipus d'adobament</i>	152
<i>Taula 11.1 Fungicides utilitzats per determinar la toxicitat dels banys i fer l'estudi econòmic</i>	156
<i>Taula 11.2. Adobament al crom. (% sobre pes de pell tripa)</i>	157
<i>Taula 11.3. Píquel de conservació (% sobre pes de pell semi-piquelada)</i>	158
<i>Taula 11.4. Continuació de la formulació adobament de pells vegetals (% sobre pes de pell semi-abodada)</i>	158
<i>Taula 11.5. Greixatge de la pell adobada al vegetal (% sobre pes de pell escorreguda)</i>	159
<i>Taula 11.6. Producte i proveïdor dels fungicides escollits</i>	165

ABREVIATURES

AA: *Alternaria alternata*

AB: *Aspergillus brasiliensis*

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

CMI, MIC, CIM: Concentració Mínima d'Inhibició

DIMPTS: diiodometil-p-tolilsulfona

EEl: Escola d'Enginyeria d'Igualada

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

HPLC: Cromatografia líquida d'alta resolució

IPBC: 3-iodo-2-propinil-N-butilcarbamat

OPP: o-fenilfenol

PCP: pentaclorofenol

PCMC: p-cloro-m-cresol

PF: *Penicillium funiculosum*

TBZ: tiabendazol

TCMTB: 2-(tiocianometiltio)-1,3-benzotiazol

TH: *Trichoderma harzianum*

GLOSARI

Abiòtic: Condicions contràries a les biòtiques, es a dir, que no forma part o no és producte del éssers vius.

Adobat: Aconseguir una estabilització del col·lagen en front fenòmens hidrolítics per l'aigua i enzims, a més de donar a la pell una resistència superior.

Agar Dextrosa de Patata: Medi de cultiu comú en microbiologia, preparat a partir d'infusió de patata i dextrosa. És el medi de cultiu més utilitzat pel creixement de fongs i bacteries.

Agar dextrosa Saboraud: Medi de cultiu basat en dextrosa però modificat per Raymond Saboraud. És un medi utilitzat pel cultiu de fongs i llevats. L'alta concentració de dextrosa i el seu pH àcid fan que sigui un medi selectiu per fongs.

Bioconcentració: Acumulació d'un producte químic en o sobre un organisme quan la font del producte químic és exclusivament aigua.

Espores: Element o cos reproductor unicel·lular, originat després d'un procés de divisió asexual, capaç de desenvolupar directa o indirectament un individu sense prèvia unió a una altra cèl·lula.

Fong: Els fongs o les floridures es poden trobar en interiors o a l'aire lliure. Estan formats per una sèrie de filaments tubulars rígids ramificats anomenats hifes, el nucli de les quals constitueix el miceli. Es propaguen i es reproduïx mitjançant espores. Creixen en condicions càlides i humides. Existeixen milers d'espècies.

Fungicida, antifúngic: Producte utilitzat per evitar o eliminar el creixement de fongs i floridures en qualsevol ambient o superfície.

Greixatge: Lubrificar les fibres del cuir per obtenir un cuir que no es trenqui a l'assecar-lo i que presenti una flexibilitat i un tacte adequats.

Hifa: Filament constituït del miceli d'un fong. Pot ser tabicada, composta per una fila de cèl·lules, o sinfonada, composta per protoplasma continu que contenen molts micelis.

Medi de cultiu: Gel o solució que conté els nutrients necessaris per permetre, en condicions favorables de pH i temperatura, el creixement de virus, microorganismes, cèl·lules, teixits vegetals o inclús petites plantes.

Miceli: Aparell vegetatiu dels fongs constituït per cèl·lules en forma de filaments (hifes).

Pell crust: Pell adobada, readobada i greixada, eventualment tenyida, però sense acabat.

Pell wet blue: Pell adobada al crom, amb un alt contingut d'aigua i sense cap tractament posterior.

Piquelat: Tractament de les pells amb solucions salines i àcides per aturar l'acció dels enzims del rendit i preparar la pell per l'adobat.

Remull: Tractament de la pell en brut amb aigua per humectar i netejar de brutícia i de productes de conservació.

Solució Ringer: Solució salina, que cada 100 ml conté: clorur de sodi 0.85 g, clorur de potassi 0.04 g i clorur de calci dihidratat 0.034 g.

Tintura: Canviar el color que té el cuir després de l'etapa d'adobament.

ANNEX A. Rectes de calibratge

Totes les rectes de calibratge s'han realitzat utilitzant la columna; **Columna Teknokroma sea18, TR-010043 3um, 0.46 x 150**. El dissolvent usat per fer les dilucions en tots els casos ha estat acetonitril, excepte pel tiabendazol (TBZ), que s'ha utilitzat metanol. Tots els resultats de les rectes de calibratges s'expressen en **mg/L**.

TCMTB

Volum d'injecció = 10µL

Longitud d'ona = 223nm

$$y = 51749x + 2336.4$$

$$r = 0.9999$$

Method set: *Adap ISO 13365_TCMTB_set*

PCMC

Volum d'injecció = 10µL

Longitud d'ona = 198nm

$$y = 184954x + 33443$$

$$r = 0.9997$$

Longitud d'ona = 201nm

$$y = 137214x + 84683$$

$$r = 0.9995$$

Longitud d'ona = 228nm

$$y = 33870x + 5389.6$$

$$r = 0.9998$$

Method set: *Adap ISO 13365_CMC OPP_set*

OPP

Volum d'injecció = 10µL

Longitud d'ona = 201nm

$$y = 90553x + 5264.1$$

$$r = 0.9998$$

Longitud d'ona = 246nm

$$y = 24247x + 559.54$$

$$r = 0.9997$$

Method set: *Adap ISO 13365_CMC OPP_set*

DIMPTS

Volum d'injecció = 10µL

Longitud d'ona = 193nm

$$y = 52070x + 8781.1$$

$$r = 0.9997$$

Longitud d'ona = 234nm

$$y = 21281x + 2653$$

$$r = 0.9998$$

Method set: *Adap ISO 13365_DIMPTS_set*

IPBC

Volum d'injecció = 10µL

Longitud d'ona = 193.4nm

$$y = 10473x - 998.79$$

$$r = 0.9996$$

Longitud d'ona = 195nm

$$y = 9201.4x + 1897.6$$

$$r = 0.9996$$

Longitud d'ona = 197nm

$$y = 7525.5x + 1554$$

$$r = 0.9995$$

Method set: *Adap ISO 13365_IPBC_set*

TBZ

Volum d'injecció = 15µL

Longitud d'ona = 300nm

$$y = 97533x + 17464$$

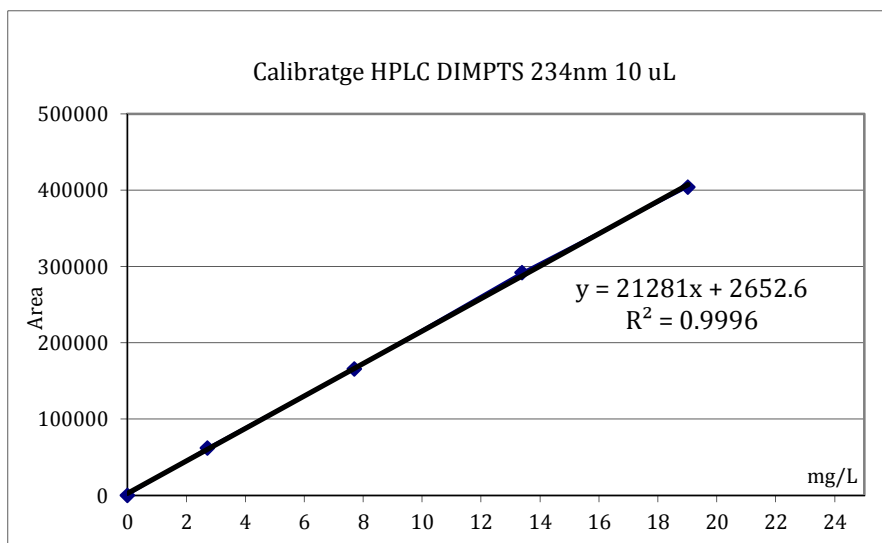
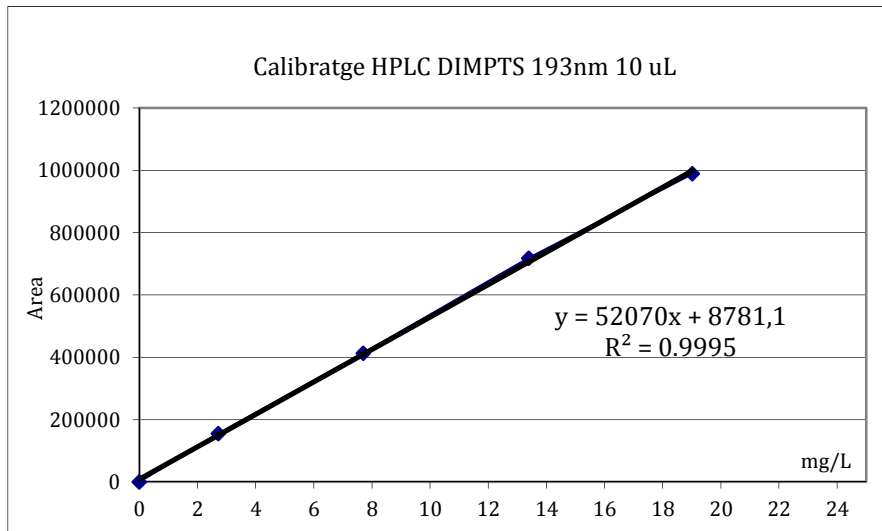
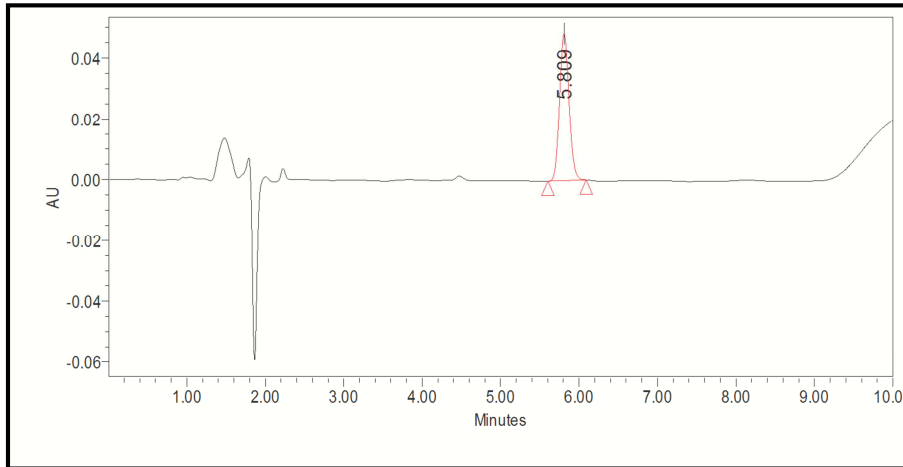
$$r = 0.9997$$

Method set: *TBZ_metanolaiqua_set*

Exemple DIMPTS

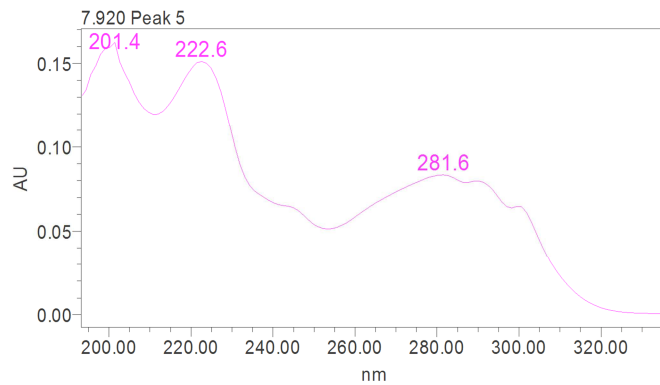
mg DIMPTS /L ACN	Àrea mitjana a 193nm	Àrea mitjana a 234nm
0	0	0
2.71	154372	62348
7.698	412183	165839
13.39	717507	291974
19.02	989362	404305

Resposta de 19.4mg DIMPTS/L, a 234nm

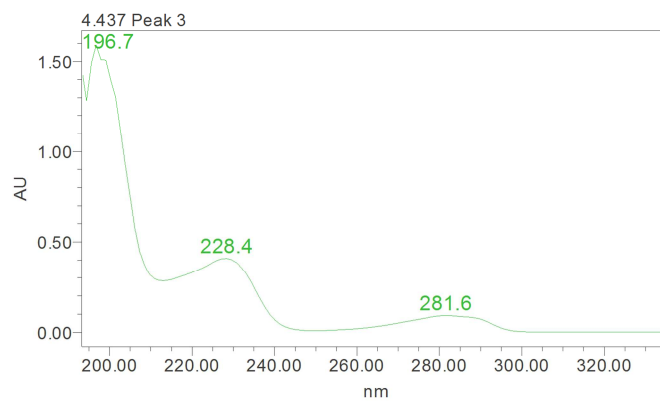


ANNEX B. Espectres UV de les molècules antifúngiques

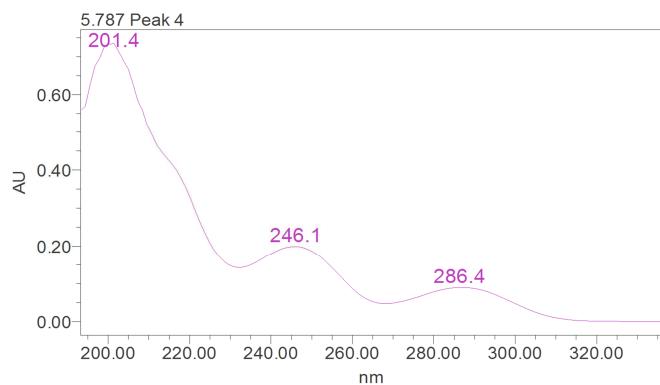
TCMTB



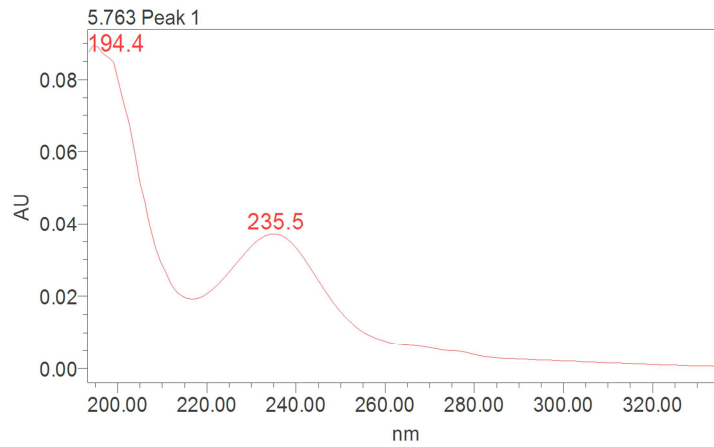
PCMC



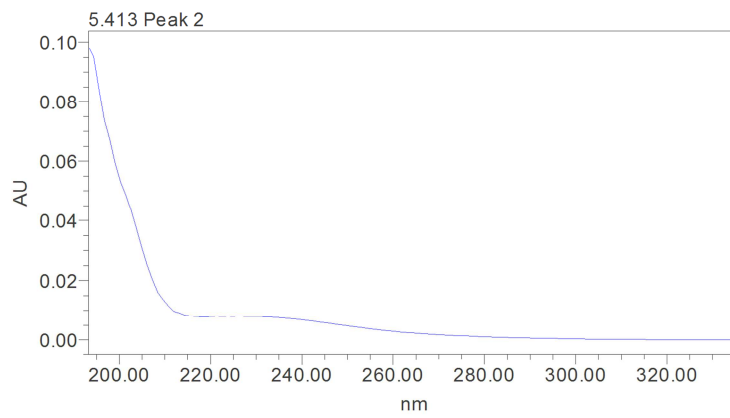
OPP



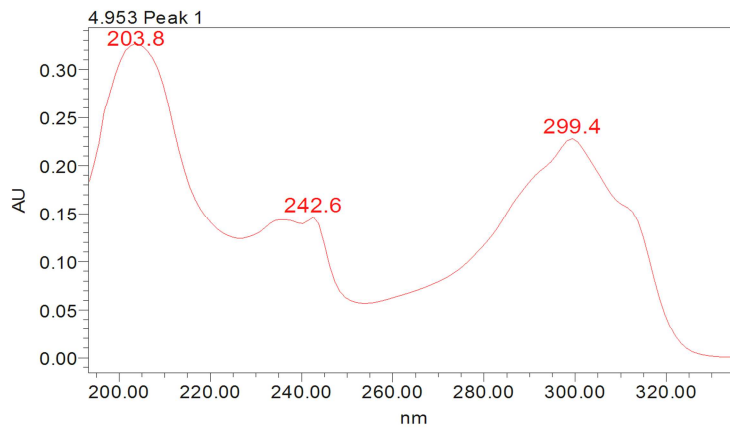
DIMPTS



IPBC



TBZ



ANNEX C. Aïllament de fongs reals de fàbrica

Informe de la CECT (Colección Espanyola de Cultivos Tipo) de la identificació de les tres mostres aïllades de fàbrica. *(veure Capítol 4)*



COLECCIÓN ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO

COLECCIÓN ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO

www.cect.org

Universidad de Valencia
Edificio 3 CUE. Parc Científic Universitat de València
Catedrático Agustín Escardino, 9
46980 Paterna (Valencia)

Tel.: + 34 963 544 612

Fax: + 34 963 543 187

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Att.: CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Dpt. Tecnología Química y Tensioactivos
At. Sara Cuadros Domènech
C/ Jordi Girona, 18-26
08034 Barcelona

Valencia, 26 de Mayo de 2011

El informe que se adjunta es para conocimiento exclusivo del interesado. El uso de estos resultados para otros fines deberá hacerse con el consentimiento escrito de la CECT.

IDENTIFICACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS.

El día 09 de Febrero de 2011 se recibieron en la CECT para su identificación tres cepas fúngicas crecidas en los medios de cultivo Sabouraud y PDA.

Cepas etiquetadas como: QF01, QF02 y LLO1

En primer lugar se realizó una observación microscópica de todas las cepas a identificar, observándose en las cepas QF01 y QF02 cuerpos fructíferos propios del género *Penicillium*.

Así pues, estas cepas fueron inoculadas en los siguientes medios de cultivo e incubadas durante 7 días a distintas temperaturas:

Czapek Yeast Extract Agar (CYA). Incubadas a 5°C, 26°C y 37°C

Malt Extract Agar (MEA). Incubadas a 26°C

Yeast Extract Sucrose Agar (YES). Incubadas a 26°C

En la cepa LL01 se observaron cuerpos fructíferos característicos del género *Trichoderma*. Para identificar a nivel de especie la cepa se siguió el procedimiento descrito por Kubicek, C. P and Harman, G.E., 1998.

La cepa fue inoculada en los medios de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar), MEA (Malt Extract Agar) y OA (Oatmeal Agar) e incubada a 26°C y 37°C.

RESULTADOS

CEPA QF01

Observación microscópica

Conidióforos con un solo punto de ramificación (Monoverticilados), característicos del subgénero *Aspergilloides*. Estipes vesiculadas. Fiálides ampuliformes de 10µm de longitud.

Conidios esféricos de paredes finamente rugosas.

Observación macroscópica

Crecimiento en CYA a 26°C: colonias de 45 mm de diámetro, de textura aterciopelada y fasciculada. Micelio de color blanco. Colonias de color verde oliva. Produce exudado de color transparente a amarillo. No produce pigmento difusible al medio. Reverso crema a amarillo pálido.

Crecimiento en CYA a 5°C y 37°C: negativo.

Crecimiento en MEA a 26°C: colonias de 53 mm de diámetro. Textura aterciopelada a flocosa. Conidios de color verde azulado. No produce exudado ni pigmento difusible al medio. Reverso crema.

Crecimiento en YES a 26°C: colonias de 50 mm de diámetro. Textura aterciopelada y fasciculadas. Micelio de color blanco. Conidios de color verde oliva. No produce exudado ni pigmento difusible al medio. Reverso crema a amarillo pálido.

Conclusión

Cepa perteneciente a la especie *Penicillium spinulosum*.

Estudio Molecular

La identificación a nivel molecular ha consistido en la amplificación y posterior secuenciación (con lecturas en las dos direcciones) de los dominios D1/D2 del extremo 5' del gen que codifica el 28S rRNA y por secuenciación parcial del gen de la β -Tubulina.

Los productos de amplificación obtenidos han sido de 545 pb y 462 pb para los dominios D1/D2 del gen 28S y del gen de la β -Tubulina, respectivamente.

Como resultado de su comparación con las secuencias existentes en las bases de datos se ha obtenido un porcentaje de identidad del 99% para el gen 28S y del 100% para el gen de la β -Tubulina con la especie indicada.

CEPA QF02

Observación microscópica

Conidióforos con un solo punto de ramificación (Monoverticilados), característico del subgénero *Aspergilloides*.

Estipes generalmente no vesiculada de aproximadamente 20 a 65 μ m de longitud.

Fiálides ampuliformes y de longitud variada (9,6 a 10 μ m).

Conidios esféricos a elipsoidales de 2,5 μ m, paredes lisas, formando cortas columnas.

Observación macroscópica

Crecimiento en CYA a 26°C: colonias de 35 mm de diámetro, textura aterciopelada. Micelio de color blanco. Conidios verde azulados con zona central más grisácea. Presentan ligero exudado de color transparente. No producen pigmento difusible al medio. Reverso crema.

Crecimiento en CYA a 37°C: colonias de 27 mm de diámetro, textura flocosa. Conidios de color verde grisáceo. No producen exudado ni pigmento difusible al medio. Reverso amarillo pálido.

Crecimiento en CYA a 5°C: negativo.

Crecimiento en MEA a 26°C: colonias de 36 mm de diámetro, textura aterciopelada. Conidios de color verde azulado. No presentan exudado ni pigmento difusible al medio. Reverso de color crema.

Crecimiento en YES a 26°C: colonias de 35 mm de diámetro, textura flocosa. Micelio de color blanco. Conidios de color verde oliva. No producen exudado ni pigmento difusible al medio. Reverso beige a marrón pálido.

Conclusión

Cepa perteneciente a la especie *Penicillium decumbens*.

Estudio Molecular

La identificación a nivel molecular ha consistido en la amplificación y posterior secuenciación (con lecturas en las dos direcciones) de las zonas del DNA ribosómico ITS1 e ITS2, que incluye al gen 5,8S rDNA y de los dominios D1/D2 del extremo 5' del gen que codifica el 28S rRNA.

Los productos de amplificación obtenidos han sido de 584 pb y 592 pb para la zona del DNA ribosómico ITS1-5.8S-ITS2 y los dominios D1/D2 del gen 28S, respectivamente.

Como resultado de su comparación con las secuencias existentes en las bases de datos se ha obtenido un porcentaje de identidad del 99% para ambas zonas con la especie *Penicillium adametzii* y de un 94% con la especie *Penicillium decumbens*.

No obstante, la cepa QF02 difiere de la especie *P.adametzii* principalmente por no presentar colonias de textura funiculosas ni fiálides menores de 8 μ m de longitud.

CEPA LLO1

Observación macroscópica

El crecimiento en los medios de cultivo utilizados presentó características similares, siendo a 37°C positivo, produciendo solamente micelio vegetativo.

Colonias de crecimiento rápido, ocupando toda la superficie de la placa en 7 días. Colonias de textura algodonosa, inicialmente de color blanco y que más tarde adquieren una tonalidad verdosa como consecuencia de la esporulación, formando pústulas (agrupamiento de los conidios) de color verde. Reverso verde pálido.

Observación microscópica

Hifas hialinas, septadas.

Conidióforos piramidalmente ramificados.

Fiálides con la base inflada, unidas al conidióforo formando grupos, principalmente hacia el ápice de la ramificación.

Conidios esféricos, de 2,5 a 3 μ m de diámetro y de paredes lisas.

Conclusión

Cepa perteneciente a la especie *Trichoderma harzianum*. (Teleomorfo *Hypocrea lixii*).

Estudio Molecular

La identificación a nivel molecular ha consistido en la amplificación y posterior secuenciación (con lecturas en las dos direcciones) de las zonas del DNA ribosómico ITS1 e ITS2, que incluye al gen 5,8S rDNA y de los dominios D1/D2 del extremo 5' del gen que codifica el 28S rRNA.

Los productos de amplificación obtenidos han sido de 430 pb y 517 pb para la zona del DNA ribosómico ITS1-5.8S-ITS2 y los dominios D1/D2 del gen 28S, respectivamente.

Como resultado de su comparación con las secuencias existentes en las bases de datos se ha obtenido un porcentaje de identidad del 99% para la zona del DNA ribosómico ITS1-5,8S-ITS2 y del 100% para el gen 28S con la especie indicada.

ANNEX D. Control de creixement de fongs

En aquest annex s'inclouen els resultats del control de creixement de fongs realitzats al llarg de tot l'estudi. Sabent que el control s'ha realitzat per triplicat, cada taula mostra:

- El percentatge de creixement dels fongs sobre la pell (expressat en %) – CS
- La mitjana del percentatge de creixement de fongs sobre la pell (expressat en %) – CS, columna ombrejada en vermell
- La zona d'inhibició creada pel producte al voltant de la pell (expressada en mm) – ZI
- La mitjana de la zona d'inhibició en cada cas (expressada en mm) – ZI, columna ombrejada en vermell
- La desviació estàndard, tant del % de creixement com de la zona d'inhibició – DS, columna ombrejada en verd.

CAPÍTOL 7(I). APLICACIÓ DE FUNGICIDES EN ADOBAMENT AL CROM

5.1. Aplicació de 0.2% de fungicida en bombos de laboratori

5.1.1. Control de creixement de fongs sobre pell wet blue

FUNGICIDA	<i>Aspergillus niger</i>					<i>CECT 2088</i>				
	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
TCMTB	0	0	0	0	0	7	5	1	4	3.1
Fenòlics	0	0	0	0	0	6	5	5	5	0.6
DIMPTS	0	0	0	0	0	23	22	21	22	1
IPBC	0	0	0	0	0	36	35	34	35	1
TBZ	100	70	50	73	25.2	5	1	0	2	2.7

<i>Trichoderma harzianum</i> CECT 2423										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
TCMTB	2	0	0	0.6	1.2	2	1	1	1.3	0.6
Fenòlics	40	0	0	13	18.9	1	1	0	0.7	0.6
DIMPTS	0	0	0	0	0	10	8	1	6	4.7
IPBC	0	0	0	0	0	26	26	25	26	0.6
TBZ	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0

<i>Penicillium spinulosum</i> QF01										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
TCMTB	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
Fenòlics	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
DIMPTS	0	0	0	0	0	16	14	13	14	1.5
IPBC	0	0	0	0	0	30	28	26	28	2
TBZ	100	100	40	80	34.6	0	0	0	0	0

<i>Penicillium decumbens</i> QF02										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
TCMTB	60	70	20	50	26.5	0	0	0	0	0
Fenòlics	20	15	10	38	5	0	0	0	0	0
DIMPTS	0	0	0	0	0	13	6	5	8	4.4
IPBC	0	0	0	0	0	34	34	30	33	2.3
TBZ	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0

<i>Trichoderma harzianum</i> LL01										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
TCMTB	40	30	20	30	10	0	0	0	0	0
Fenòlics	15	2	0	6	8.1	0	0	0	0	0
DIMPTS	0	0	0	0	0	15	12	10	12	2.5
IPBC	0	0	0	0	0	32	30	26	29	3.1
TBZ	100	100	70	90	17.3	0	0	0	0	0

5.2. Aplicació de diferents quantitats de fungicida

5.2.1. Control de creixement de fongs sobre la pell wet blue

<i>Aspergillus niger</i> CECT 2088										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
DIMPTS 1	0	0	0	0	0	22	22	21	22	0.6
DIMPTS 2	0	0	0	0	0	22	21	20	21	1.0
DIMPTS 3	0	0	0	0	0	21	20	19	20	1.00
DIMPTS 4	0	0	0	0	0	45	21	20	29	14.2
IPBC 1	0	0	0	0	0	45	35	0	27	2.6
IPBC 2	0	0	0	0	0	45	45	45	45	0
IPBC 3	0	0	0	0	0	45	37	36	39	4.9
IPBC 4	0	0	0	0	0	45	45	45	45	0

<i>Trichoderma harzianum</i> CECT 2423										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
DIMPTS 1	0	0	0	0	0	14	14	10	13	2.3
DIMPTS 2	0	0	0	0	0	13	12	11	12	1.0
DIMPTS 3	0	0	0	0	0	16	15	14	15	1.0
DIMPTS 4	0	0	0	0	0	15	13	13	14	1.2
IPBC 1	100	10	1	37	54.7	0	0	0	0	0
IPBC 2	0	0	0	0	0	17	12	8	12	4.5
IPBC 3	0	0	0	0	0	25	22	21	23	2.1
IPBC 4	0	0	0	0	0	21	20	18	20	1.5

CAPÍTOL 7(II). APLICACIÓ DE FUNGICIDES EN ADOBAMENT AL CROM

5.1.1. Control de creixement de fongs sobre la pell wet blue

<i>Aspergillus niger</i> CECT 2088										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
DIMPTS	0	0	0	0	0	15	14	12	14	1.5
IPBC	0	0	0	0	0	45	45	33	41	6.9

<i>Trichoderma harzianum</i> CECT 2423										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
DIMPTS	0	0	0	0	0	11	10	9	10	1
IPBC	0	0	0	0	0	28	26	25	26	1.5

<i>Penicilium spinulosum</i> QF01										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
DIMPTS	0	0	0	0	0	19	15	13	16	3.1
IPBC	0	0	0	0	0	28	27	26	27	1

<i>Penicilium decumbens</i> QF02										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
DIMPTS	10	5	5	7	2.9	0	0	0	0	0
IPBC	0	0	0	0	0	28	26	23	26	2.5

<i>Trichoderma harzianum</i> LL01										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
DIMPTS	60	40	15	38	22.5	15	13	12	13	1.5
IPBC	0	0	0	0	0	27	26	25	26	1

CAPÍTOL 8. APLICACIÓ DE FUNGICIDES EN PÍQUEL DE CONSERVACIÓ

5.1. Efectivitat dels fungicides alternatius en un píquel de conservació

5.1.1. Control de creixement de fongs sobre la pell piquelada

<i>Aspergillus niger</i> CECT 2088										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
TCMTB	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
DIMPTS	10	5	2	6	4,1	0	0	0	0	0
IPBC	10	5	0	5	5	2	0	0	1	1,2

<i>Trichoderma harzianum</i> CECT 2423										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
TCMTB	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
DIMPTS	100	0	0	33	47.1	1	1	0	1	0.6
IPBC	100	95	90	95	4.1	0	0	0	0	0

<i>Penicillium spinulosum</i> QF01										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
TCMTB	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
DIMPTS	40	35	30	35	5	0	0	0	0	0
IPBC	100	100	70	90	17.3	0	0	0	0	0

<i>Penicillium decumbens</i> QF02										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
TCMTB	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
DIMPTS	70	60	40	57	15.3	0	0	0	0	0
IPBC	100	100	70	90	17.3	0	0	0	0	0

<i>Trichoderma harizianum</i> LL01										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
TCMTB	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
DIMPTS	5	0	0	2	2.9	6	6	0	4	3.5
IPBC	0	0	0	0	0	10	7	5	7	2.5

5.2. Aplicació de diferents quantitats de fungicida

5.2.1. Control de creixement de fongs sobre la pell piquelada

<i>Aspergillus niger</i> CECT 2088										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
DIMPTS 1	100	100	100	100	51.1	0	0	0	0	0
DIMPTS 2	92	5	2	33	2.9	12	7	0	6	6.0
DIMPTS 3	5	0	0	2	1.2	12	10	0	7	6.4
DIMPTS 4	2	0	0	1	0	16	12	9	12	3.5
IPBC 1	0	0	0	0	0	21	21	4	15	9.8
IPBC 2	0	0	0	0	0	45	45	45	45	0
IPBC 3	0	0	0	0	0	45	45	45	45	0
IPBC 4	0	0	0	0	0	45	45	45	45	0

<i>Trichoderma harzianum</i> CECT 2423										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
DIMPTS 1	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
DIMPTS 2	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
DIMPTS 3	30	20	10	20	10	0	0	0	0	0
DIMPTS 4	70	5	0	25	39.1	1	0	0	0	0.6
IPBC 1	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
IPBC 2	100	85	50	78	25.7	0	0	0	0	0
IPBC 3	20	10	2	11	9.02	0	0	0	0	0
IPBC 4	75	15	0	30	39.7	45	0	0	15	26.0

<i>Penicillium spinulosum</i> QF01										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
DIMPTS 1	100	100	98	99	1.2	0	0	0	0	0
DIMPTS 2	20	8	5	11	7.9	0	0	0	0	0
DIMPTS 3	20	5	2	9	9.6	0	0	0	0	0
DIMPTS 4	15	5	2	7	6.8	0	0	0	0	0
IPBC 1	100	95	85	93	7.6	0	0	0	0	0
IPBC 2	40	0	0	13	23.1	2	1	0	1	1.0
IPBC 3	0	0	0	0	0	45	7	5	19	22.5
IPBC 4	0	0	0	0	0	8	7	3	6	2.7

CAPÍTOL 9. APLICACIÓ DE FUNGICIDES EN GREIXATGE VEGETAL

5.1.1. Control de creixement de fongs sobre pell vegetal

<i>Aspergillus niger</i> CECT 2088										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
TCMTB	50	40	30	40	10.0	0	0	0	0	0
DIMPTS	0	0	0	0	0	8	6	6	7	1.2
IPBC	0	0	0	0	0	16	15	13	15	1.5

<i>Trichoderma harzianum</i> CECT 2423										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
TCMTB	25	2	0	9	11.3	0	0	0	0	0
DIMPTS	0	0	0	0	0	9	6	6	7	1.7
IPBC	0	0	0	0	0	13	13	12	13	0.6

<i>Penicillium spinulosum</i> QF01										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
TCMTB	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
DIMPTS	0	0	0	0	0	3	2	1	2	1
IPBC	0	0	0	0	0	4	3	3	3	0.6

<i>Penicillium decumbens</i> QF02										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
TCMTB	2	0	0	1	1.2	10	7	4	7	3
DIMPTS	0	0	0	0	0	20	5	6	10	8.4
IPBC	0	0	0	0	0	26	20	10	19	8.1

<i>Trichoderma harizianum</i> LL01										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
TCMTB	90	80	60	77	15.3	0	0	0	0	0
DIMPTS	0	0	0	0	0	4	3	1	3	1.5
IPBC	0	0	0	0	0	9	5	5	6	2.3

5.2. Aplicació de diferents quantitats de fungicida

5.2.1. Control de creixement de fongs sobre la pell vegetal

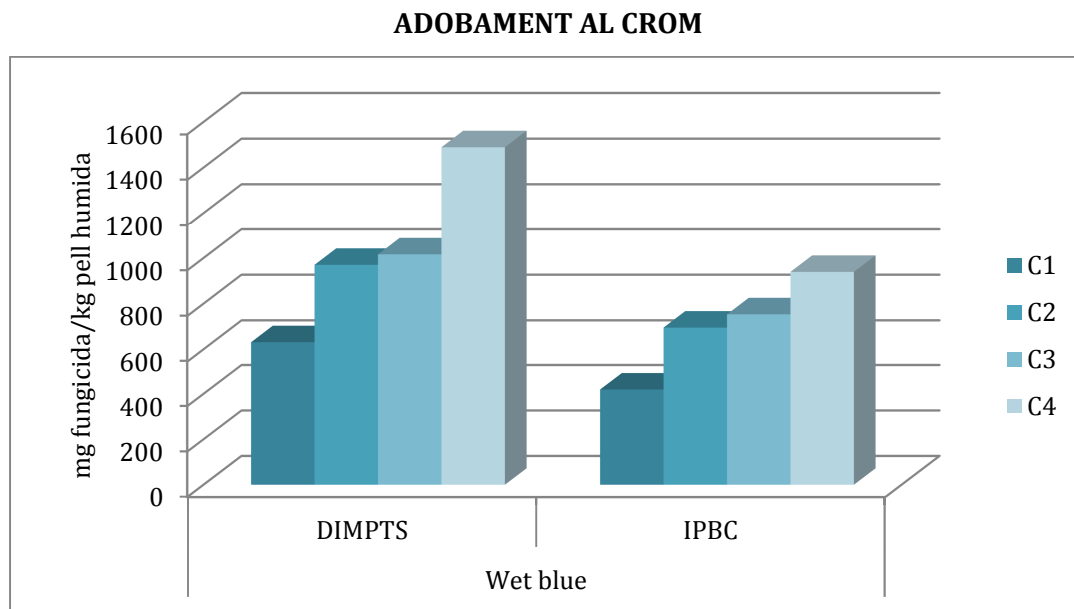
<i>Aspergillus niger</i> CECT 2088										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	95	80	60	78	0.6	0	0	0	0	0
DIMPTS 1	1	0	0	0.3	0	4	2	0	2	2.0
DIMPTS 2	0	0	0	0	0	9	6	6	7	1.7
DIMPTS 3	0	0	0	0	0	9	7	6	7	1.5
DIMPTS 4	0	0	0	0	0	24	21	19	21	2.5
IPBC 1	0	0	0	0	0	11	10	9	10	1.0
IPBC 2	0	0	0	0	0	20	17	7	15	6.8
IPBC 3	0	0	0	0	0	22	21	20	21	1.0
IPBC 4	0	0	0	0	0	31	25	22	26	4.6

<i>Trichoderma harzianum</i> CECT 2423										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
DIMPTS 1	15	12	10	12	2.5	0	0	0	0	0
DIMPTS 2	5	0	0	2	2.9	7	6	0	4	3.8
DIMPTS 3	0	0	0	0	0	11	10	7	9	2.1
DIMPTS 4	0	0	0	0	0	16	3	2	7	7.8
IPBC 1	45	40	35	40	5.0	0	0	0	0	0
IPBC 2	15	10	8	11	3.6	0	0	0	0	0
IPBC 3	15	2	1	6	7.8	0	0	0	0	0
IPBC 4	2	1	0,5	1	0.8	0	0	0	0	0

<i>Penicillium spinulosum</i> QF01										
FUNGICIDA	CS	CS	CS	CS	DS	ZI	ZI	ZI	ZI	DS
CONTROL	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0
DIMPTS 1	1	0.5	0.5	0.7	0.3	0	0	0	0	0
DIMPTS 2	0.5	0	0	0.2	0.3	2	1	0	1	1.0
DIMPTS 3	2	0	0	0.7	1.2	6	6	5	6	0.6
DIMPTS 4	0	0	0	0	0	16	12	9	12	3.5
IPBC 1	0	0	0	0	0	6	4	2	4	2.0
IPBC 2	0	0	0	0	0	10	8	5	8	2.5
IPBC 3	0	0	0	0	0	14	10	9	11	2.6
IPBC 4	0	0	0	0	0	15	14	12	14	1.5

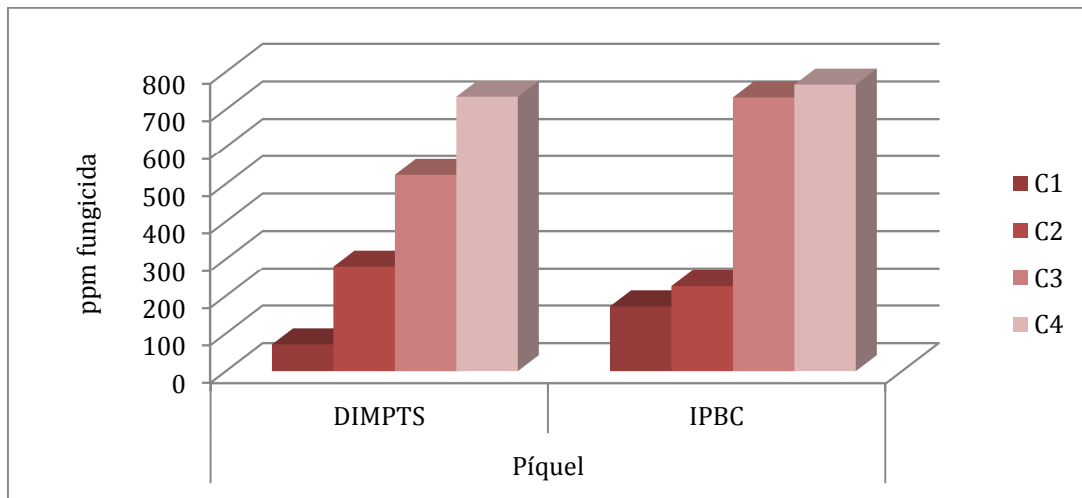
ANNEX E. Contingut total de fungicida a la pell. Estudi de quantitats mínimes

Les Gràfiques E.1., E.2., E.3. mostren la relació de quantitats de fungicida a la pell expressades en mg sobre kg de pell assecada en condicions normalitzades (23°C i 50% d'humitat relativa). S'ha determinat el fungicida seguint el mètode descrit a la norma EN ISO 13365 (Font J. et al. 2011) (veure Capítol 3, apartat 4.3.).



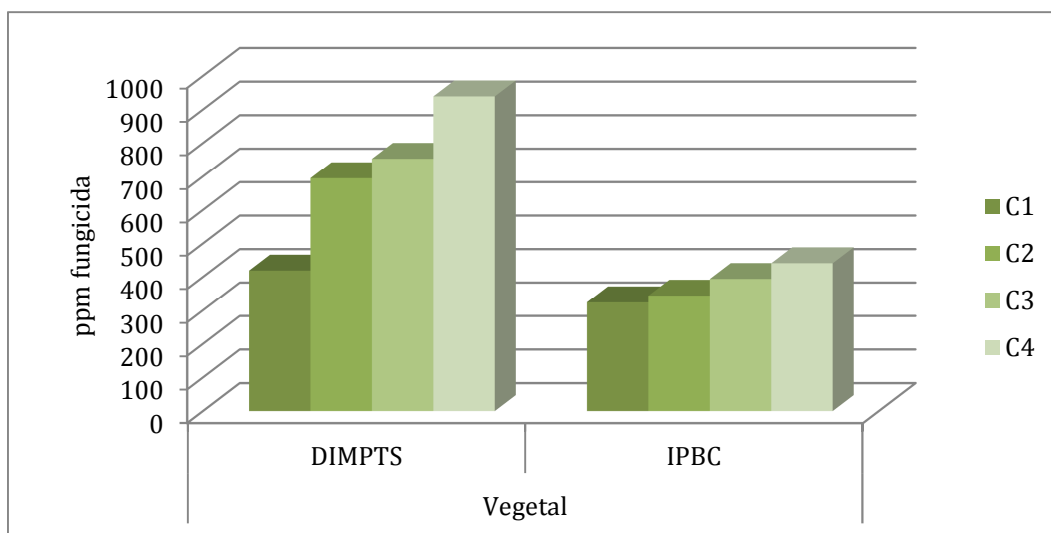
Gràfica E.1. Quantitat total de fungicida determinada a la pell wet blue. Estudi de concentracions mínimes

PÍQUEL DE CONSERVACIÓ



Gràfica E.II. Quantitat total de fungicida determinada a la pell piquelada. Estudi de concentracions mínimes

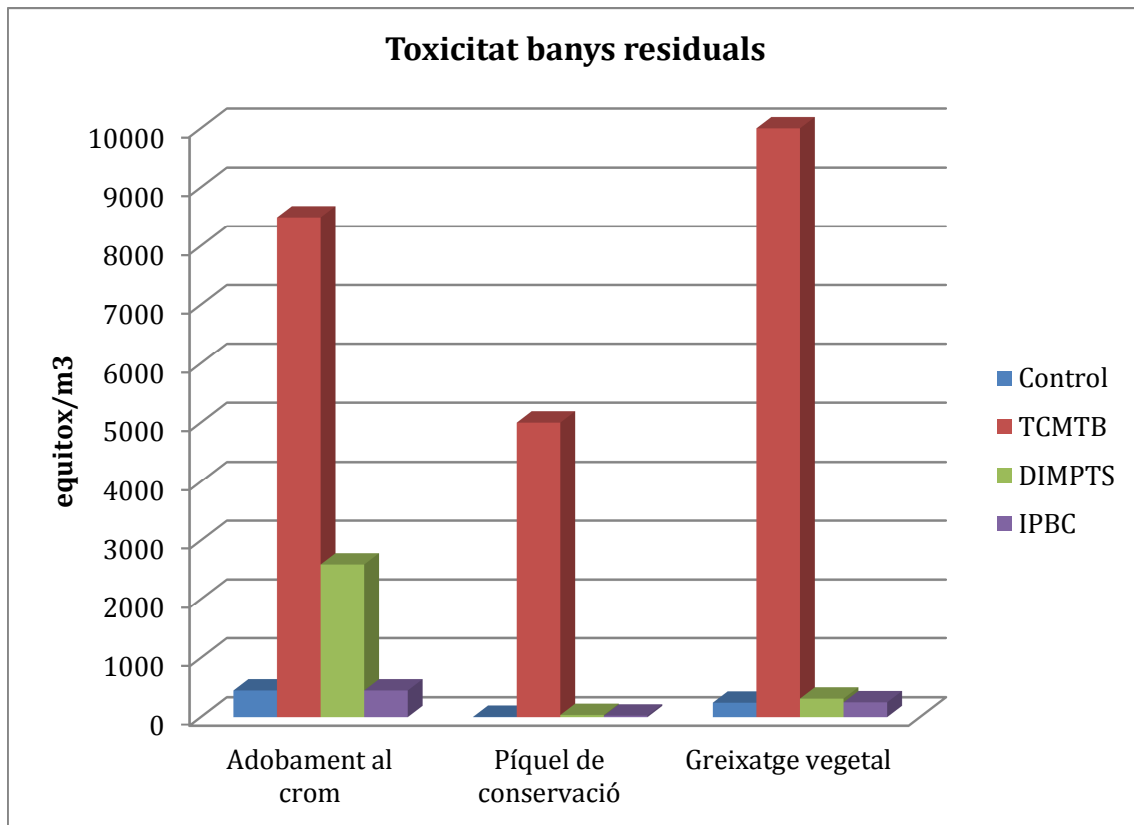
GREIXATGE VEGETAL



Gràfica E.III. Quantitat total de fungicida determinada a la pell vegetal. Estudi de concentracions mínimes

Com més gran és el percentatge de fungicida afegit al procés, major quantitat de fungicida es determina a la pell, tot i que no es compleix la proporció entre les mostres. Possiblement sigui degut a que la pell és una matriu irregular i el fungicida no es disposa uniformement al llarg de tota la mostra. Com més fungicida afegit, més gran és el contingut de producte determinat a la pell, encara que la relació entre les diferents quantitats afegides no és proporcional.

ANNEX F. Toxicitat banys residuals



ANNEX G. Difusió dels resultats

En aquest Annex s'inclouen els diferents articles i presentacions de les investigacions realitzades.

Alternative Fungicides: Comparisons with Conventional Chemicals

SARA CUADROS¹, M^aÀNGELS MANRESA³, JOAQUIM FONT², M^a ELENA BAUTISTA¹,
FERNANDO MALDONADO¹ and AGUSTÍ MARSAL¹

¹ Institut de Química Avançada de Catalunya, IQAC, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),
Jordi-Girona 18-26, Barcelona, Spain, Teléfono 34 93 400 61 55

² Escola d'Enginyeria d'Igualada, EEI, Universitat Politècnica de Catalunya, (UPC), Plaza del Rey 15, Igualada

³ Facultat de Farmàcia, Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona (UB), Diagonal 27-31,
Barcelona, Spain

Abstract

This work is focussed on the search for alternatives to the fungicides conventionally used in the tanning industry. These alternatives should have a high efficiency towards a wide range of fungi and should be less toxic, more environmentally friendly and cost effective.

The main objective of this work is to evaluate the fungicidal capacity of the selected compounds (registered in the 98/8/EC Directive); diiodomethyl-p-tolylsulfone (DIMPTS), 3-iodo-2-propynyl-N-butylcarbamate (IPBC) and thiobendazole (TBZ, 2-thiazol-4-yl-1H-benzo imidazole), against different strains of fungi. The fungicidal capacity of the selected compounds has been compared with that of fungicides conventionally used in tannery such as TCMTB and a proprietary mixture of phenolic compounds.

The fungicidal capacity of the selected molecules was tested against strains of the following fungi, described in the literature as responsible for damage during the process of leather manufacture: *Aspergillus niger*, *Trichoderma harzianum*, *Alternaria alternata* and *Penicillium funiculosum*.

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the studied molecules against the selected fungi has been determined. Thereafter, a comparative study of the fungicidal capacity of the selected fungicides at different offers has been carried out with wet-blue leather. The results obtained confirm that two of the three fungicides studied diiodomethyl-p-tolylsulfone (DIMPTS) and 3-iodo-2-propynyl-N-butylcarbamate (IPBC) are good candidates as alternative fungicides to be used in the leather industry. Their potential application against a wider spectrum of fungi especially those isolated in tannery constitutes the aim of the next study together with toxicity evaluation associated to such application and the determination of the fungicide that remain in the different layers of leather.

1. INTRODUCTION

After flaying, hides are attacked by bacteria, resulting in a total decomposition of the hide by the enzymes produced unless the hide is subjected to a curing process (salting) together with the addition of a bactericide. The raw hide must be protected from bacterial attack in operations that follow flaying, *i.e.* storage and soaking.

However, hides subjected to subsequent manufacturing steps *i.e.* pickling, tanning, dyeing and fatliquoring are susceptible to fungal attack and for these hides, the application of an effective fungicide is necessary. Hide attacked by fungi is evidenced by the presence of permanent stains and impaired physical properties due to collagen degradation.¹

Wet-blue leather provides suitable conditions for the growth of fungi: storage temperature, acid pH, presence of water, proteins and fats. A rise in temperature often leads to an increase in micro-organism growth. The optimum conditions for the growth of several fungi (*Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Trichoderma sp.*, *Rhizopus sp.* and *Mucor sp.*) are a pH range between

neutral and slightly acid (3-6), a temperature of 25°C and humidity between 12 and 15%.²

In accordance with Hauber,³⁻⁵ for a compound to be an effective fungicide, the requirements are: optimal activity against fungi, compatibility with hide and with chemicals used for processing leather, effectiveness at acid pH, stability with respect to temperature and UV light, low solubility in water, low toxicity to humans and economically and environmentally acceptable. Although a large number of compounds meet these requirements to a greater or lesser extent,⁶⁻¹⁰ TCMTB possesses a wider range of application and has achieved the highest acceptance level in the tanning industry. However, its technical limitations and the considerable environmental impact of TCMTB^{11,12} reinforce the need to look for new fungicides to replace those conventionally used.¹³

The fungicides studied in this work have been selected in accordance with the 98/8/EC Directive.^{14,15} By means of this Directive, the European Union has established a normative framework for the commercialization of biocides so as to minimise risk to health and the environment.

* Corresponding authors: IQAC ammeco@iiqab.csic.es and joaquim.font@eei.upc.edu

2. AIM OF THE WORK

The main objective of this work is to evaluate the fungicidal capacity of the selected compounds (registered in the 98/8/EC Directive) against different strains of fungi. The fungicidal capacity of the selected compounds will be compared with that of fungicides conventionally used in tannery such as TCMTB and a mixture of phenolic compounds.

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the studied molecules against the selected fungi has been determined. Thereafter, a comparative study of the fungicidal capacity of the selected fungicides at different offers will be carried out with wet-blue leather.

3. MATERIALS AND METHODS

The following three compounds were selected to evaluate their potential application as fungicides in the leather sector: diiodomethyl-p-tolylsulfone (DIMPTS) (provided by Dow Chemicals), 3-iodo-2-propynyl-N-butylcarbamate (IPBC) (provided by Lanxess) and thiobendazole (TBZ) (provided by Tecnidex). Figure 1 shows the chemical structure of these compounds together with that of 2-(thiocyanomethylthio)-1,3-benzothiazole, TCMTB (provided by Lamirsa) and a

mixture of phenolic compounds (provided by Lanxess) used for comparison. The selection of fungicides was based on the following criteria: proved fungicidal capacity in other industrial sectors, compounds of different chemical family and compatibility with the substrate and with the conditions of application.

The fungicidal capacity of the selected fungicides was carried out against strains of the following fungi, which are described in the literature as responsible for damage during the process of leather manufacture: *Aspergillus niger* (CECT 2088), *Trichoderma harzianum* (CECT 2423), *Alternaria alternata* (CECT 2662) and *Penicillium funiculosum* (CECT 2914), which were submitted by the Spanish Type Culture Collection (CECT) from Valencia University. Given that all the strains were received lyophilized, except *Alternaria alternata*, they were reconstituted in a suitable nutrient medium up to the production of viable spores. A suspension of spores of each strain was prepared with Ringer's solution. Thereafter, the counting of spores was carried out under the microscope and by the plate count method on sabouraud dextrose agar (Oxoid, Basingstoke, UK). Afterwards the inoculum suspension was adjusted to 10^5 spores/mL. Antifungal assays in leather samples were made using potato dextrose agar (Oxoid, Basingstoke, UK).

FUNGICIDE	CHEMICAL STRUCTURE
2-(thiocyanomethylthio)-1,3-benzothiazole TCMTB (~30% active ingredient) (CAS 64441-45-8)	
Mixture of phenolic compounds (PCMC + OPP) (p-chlorometacresol + orthophenylphenol) (~40% active ingredient) CAS: PCMC 59-50-7 : OPP 90-43-7)	
Diiodomethyl-p-tolylsulfone DIMPTS (~ 40% active ingredient) (CAS 20018-09-1)	
3-iodo-2-propynyl-N-butylcarbamate IPBC (~ 30% active ingredient) (CAS 55406-53-6)	
Thiobendazole TBZ (~ 60% active ingredient) (2-thiazol-4-yl-1h-benzoimidazole) (CAS 148-79-8)	

Figure 1. Molecular structure of fungicides used.

3.1 Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Minimum inhibitory concentration (MIC) is defined as the lowest concentration (expressed in µg/mL) of an antimicrobial that will inhibit the visible growth of a micro-organism after an incubation period. The antimicrobials are dissolved at different concentrations together with a standardized amount of the isolated micro-organism. Thereafter, the solutions are incubated at 26 to 30°C for 18-24 hours and allowed to set until micro-organism growth is observed. The minimum amount of antimicrobial which is necessary to inhibit the fungal growth provides the minimum inhibitory concentration. Each antimicrobial has a specific MIC for each different micro-organism.¹⁶

To determine the minimum inhibitory concentration, several dilutions at concentrations ranging from 10240µg/mL to 0.078µg/mL of the fungicides under study were prepared. One mL of each dilution was mixed with 20mL of melted sabouraud dextrose agar medium and poured into a plate to which one drop of each inoculum suspension was plated onto the medium, each test was carried out in duplicate. Plates were incubated at 25°C for 96 hours. Plates without fungicides were used as positive control. The plate with the lowest concentration where fungal growth was not observed provided the minimum concentration that inhibited growth, *i.e.* the minimum inhibitory concentration of the fungicide.¹⁷

3.2 Preparation of a wet-blue skin free of bactericides and fungicides

The study of fungi growth was carried out on a wet-blue skin. In order to avoid possible interferences with the fungicides under evaluation, a wet-blue skin was prepared ensuring that no bactericides and fungicides were added in the soaking process.

The tanning process was carried out in accordance with the recipe shown in Table I.

TABLE I Tanning recipe for pickled skin free from bactericides and fungicides	
Offers on pelt weight	
60% H ₂ O	
4% NaCl	
4% chromium salt 33% basicity	Drum 1/2 hours
4% chromium salt 33% basicity	Drum 3 hours
1% sodium formate	Drum 3 hours
<i>Rest overnight</i>	
pH(2.8-3.0)	
2% sodium hydrogen carbonate	Drum 3 hours
pH(3.5-4.0)	
Ts > 100°C Drain off	

3.3 Control of fungal growth on wet-blue skin

Samples of 250mm x 250mm were cut from the wet-blue skin. In order to simulate real application conditions, the wet-blue samples were placed in a closed vessel and shaken with a solution of the corresponding amount of fungicide and 100% of water

(on wet-blue weight) for three hours. The mould growth resistance of the treated samples was tested in accordance with the ASTM Standard D4576-01¹⁸ against two different strains (*Aspergillus niger* and *Trichoderma harzianum*), which are the most invasive strains of those previously mentioned. A wet-blue sample without fungicide was used as control for comparative purposes.

After shaking, the fungicide treated samples were placed on sterile plates surrounded by potato dextrose agar culture medium. After solidification of the agar, one drop of the spore suspension (1 x 10⁶ spores per mL) of each mould was deposited directly on the sample and other one on the culture medium as shown in Figure 2.

Each test was carried out in triplicate. The plates were stored in a humid atmosphere at 26°C and the control of fungal growth was performed weekly against the control sample. The percentage (from 0% to 100%) of wet-blue sample surface overgrown by mould was recorded. This control was carried out for a period of 90 days. After three months, the wet-blue samples free from mould growth were stored in hermetically sealed plastic bags to check the mould growth resistance after a long period.

Two different growth controls were carried out:

3.3.1 Offers of 0.1%, 0.5%, 1% of fungicide

Three different offers (0.1%, 0.5%, and 1% on wet-blue weight) of each of the five selected fungicides in 100% of water were studied.

3.3.2 Comparative study with 0.2% of fungicide

The results obtained in the tests described above revealed that an offer of 0.2% on wet-blue weight in 100% of water could provide satisfactory mould growth resistance. Consequently, a comparative study with 0.2% of each of the selected fungicides was performed.

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1 Determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MIC)

Table II shows the results of the MICs of the five selected fungicides against the strains of the fungi considered.

TABLE II MICs, in µg/mL, of each of the studied fungicides against the fungi assayed				
Fungicide	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Alternaria alternata</i>
TCMTB	7.6	15.3	7.6	0.95
Mix of phenolics	62	31	124	62
DIMPTS	3.8	1.9	7.6	1.1
IPBC	0.8	1.9	3.9	0.8
TBZ	3.9	0.95	1.9	–

The results shown in Table II confirm the good fungicidal capacity of the chemicals conventionally

used in the leather industry. Likewise, the three selected alternative compounds show potential applicability as fungicides in the tannery sector. In general, the alternative compounds have a lower minimum inhibitory concentration than the chemicals conventionally used.

4.2 Control of fungal growth on wet-blue skin

The results obtained of fungal growth resistance on wet-blue skin are shown next:

4.2.1 Offers of 0.1%, 0.5%, 1% of fungicide

The easiest way to evaluate the results obtained in this study is to observe the images of fungal growth in the treated wet-blue samples placed in the plates. However, in accordance with the ASTM Standard,¹⁸ the report of results of mould growth is rated as a percentage of wet-blue surface covered by mould. We found that wet-blue samples with 0% of mould growth in their surface had mould growing around the samples, therefore in order to be more precise in the report of the results, we have introduced another parameter called 'inhibition zone' (Fig. 2), which can be defined as the area on an agar plate where growth of the mould is prevented by the fungicide placed on the wet-blue leather sample.

In Table III, an inhibition zone of 45mm means that no mould growth on the agar plate was observed. As expected, all control samples (without fungicide) had a 100% of surface growth after one or two weeks of testing and the inhibition zone was 0mm. For TCMTB, the sample surface growth was not observed for any of the three offers considered (0.1, 0.5 and 1.0%) nor for any of the fungi studied. In the case of *Aspergillus niger*, the inhibition zone was maximum (45mm) even for the lowest offer, *i.e.* the lowest offer was sufficient to impede the growth of mould in the plate.

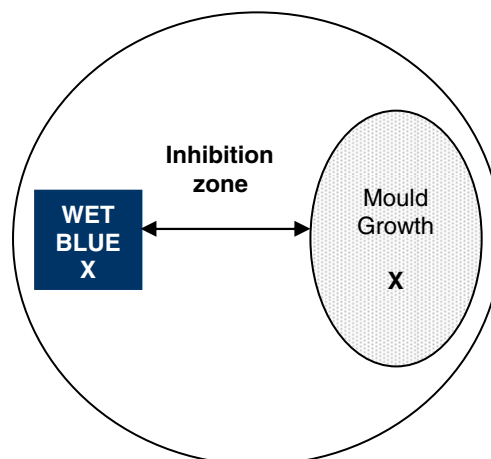


Figure 2. Sample with inoculum locations (X). Inhibition zone provided by the fungicide impregnated wet-blue sample.

On the contrary, the growth of *Trichoderma harzianum* on the plates was observed for all of the three offers of fungicide considered so that the highest offer applied resulted in the lowest fungal growth. In summary, 0.1% of TCMTB on wet-blue weight is sufficient to protect against *Aspergillus niger* and barely adequate against *Trichoderma harzianum*.

When the mixture of phenolic compounds is considered, an offer of 0.1% was not sufficient for either of the two fungi studied since after 90 days of testing the percentage of sample surface growth was between 70% and 100%. An offer of 0.5% on wet-blue weight of the mixture of phenolic compounds was sufficient to protect the leather samples against both fungi, whilst the protection provided by a 1% offer was much higher. All of this can be observed in Figure 3.

With the lowest offer of DIMPTS (0.1% on wet-blue weight), the sample's surface growth was inhibited but mould growth was observed in the agar culture

% of fungicide		<i>Aspergillus niger</i>		<i>Trichoderma harzianum</i>	
		Surface growth (%)	Inhibition zone (mm)	Surface growth (%)	Inhibition zone (mm)
0.1%	TCMTB	0	45	4	0
	Mix of phenolics	77	0	98	0
	DIMTPS	0	15	0.5	2
	IPBC	0	26	0	15
	TBZ	53	0	100	0
0.5%	TCMTB	0	45	0	5
	Mix of phenolics	0	18	0	19
	DIMTPS	0	16	0	8
	IPBC	0	36	0	30
	TBZ	0	22	100	0
1%	TCMTB	0	45	0	8
	Mix of phenolics	0	35	0	30
	DIMTPS	0	45	0	10
	IPBC	0	45	0	32
	TBZ	0	38	0	32
CONTROL		100	0	100	0

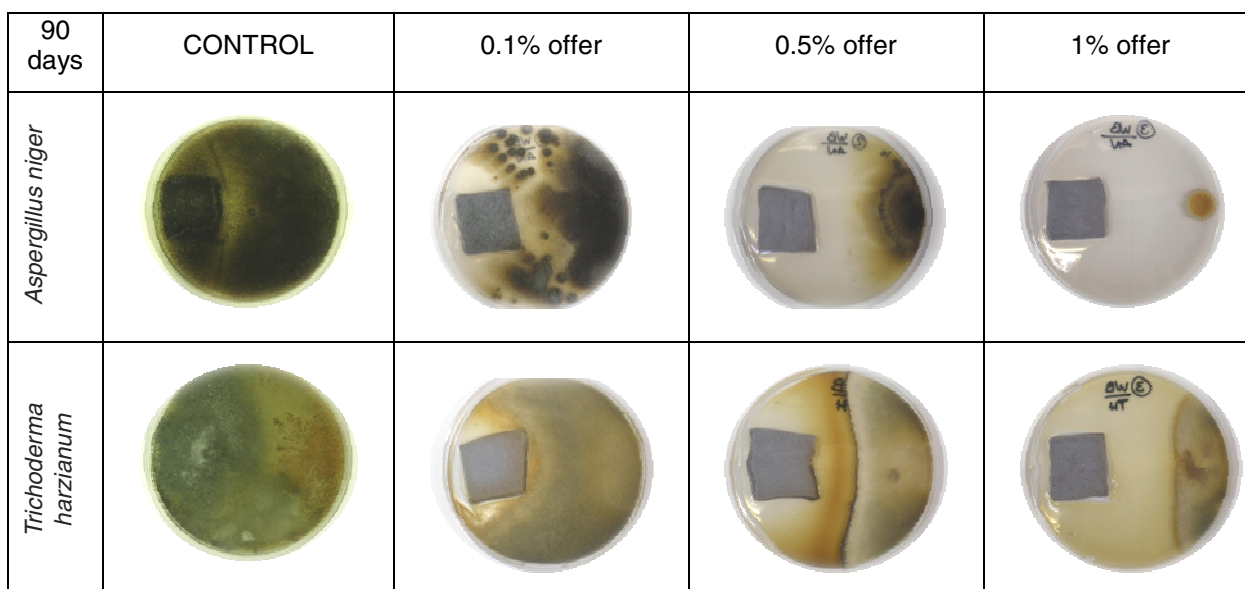


Figure 3. Results of the fungicidal capacity of different offers of the proprietary phenolic compound mixture after 90 days of testing.

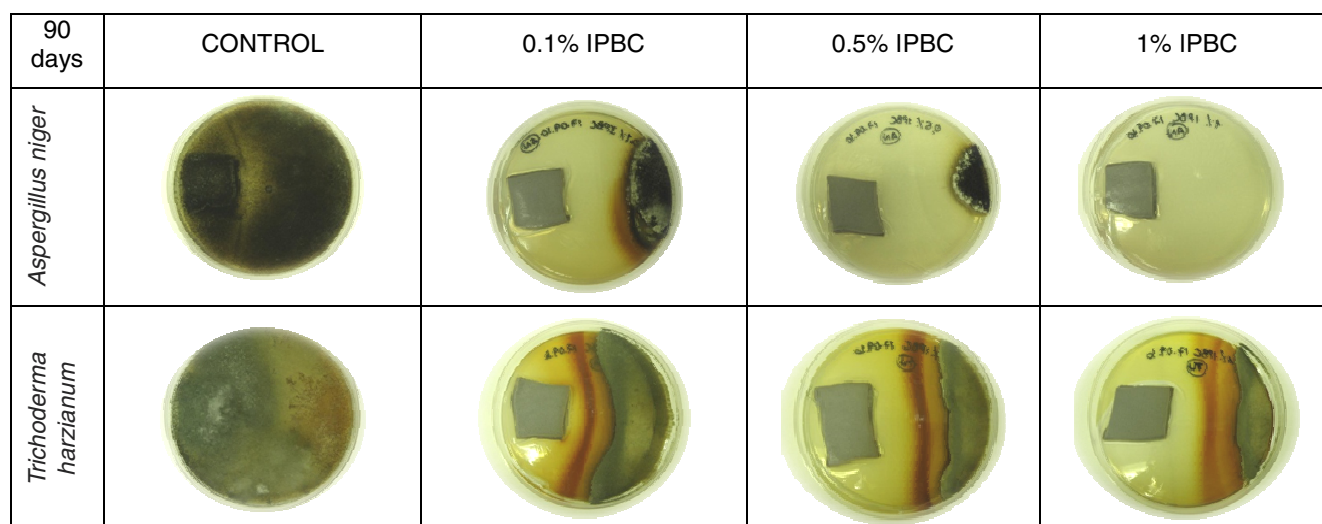


Figure 4. Results of the fungicidal capacity of different offers of IPBC after 90 days of testing.

medium. However, the diffusion caused by the treated sample was sufficient to impede the progress of the mould. A higher offer would confer higher protection but it would be completely unnecessary.

For IPBC, no mould growth was observed in the wet-blue sample surface for any of the three selected offers. Therefore, an offer of 0.1% on wet-blue weight of IPBC was sufficient to control mould growth in sample surface. An offer ten fold higher (1%) avoided almost totally the mould growth on the plates also thanks to the diffusion of the treated wet-blue sample. Figure 4 shows the results obtained with IPBC.

In accordance with the results obtained for TBZ, it can be confirmed that the application of this chemical in the tannery was not very efficient against the selected fungi or, at least, the commercial formulation as tested was not effective. Effective anti-mould behaviour would require a very high level of product and this would not be either economical or environmentally advisable. TBZ

against *Trichoderma harzianum* was only effective with an offer of 1% on wet-blue weight whereas an offer of 0.5% was necessary to be efficient against *Aspergillus niger*.

4.2.2 Comparative study with 0.2% of fungicide

In accordance with the results obtained in the previous section, a comparative study with 0.2% on wet-blue weight in 100% of water of each of the selected fungicides was performed to check if this offer was sufficient to avoid mould growth not only on the wet-blue sample surface but also on the plates.

In the case of *Aspergillus niger*, the offer of 0.2% of fungicide was sufficient to avoid mould growth both in leather samples and in plates for all fungicides except for the mixture of phenolic compounds. When the study was carried out with *Trichoderma harzianum*, mould growth in the wet-blue samples was avoided by the alternative fungicides which also caused a wider

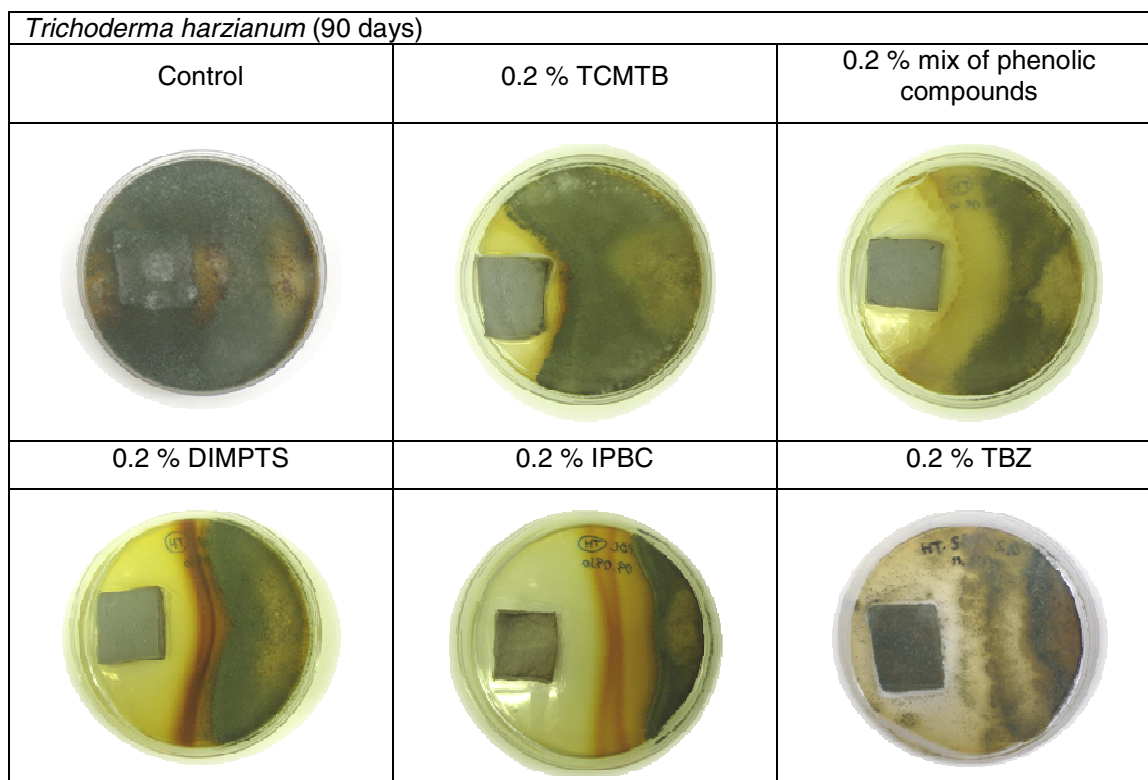


Figure 5. Results of the fungicidal capacity of 0.2% of the five selected chemicals against *Trichoderma harzianum* after 90 days of testing.

inhibition zone on the plates, except for TBZ. However, 0.2% of the conventional fungicides (phenolic mixture and TCMTB) was not sufficient to impede the progress of the hyphae towards the wet-blue samples, which were partially covered by mould. Figure 5 shows the results obtained in the comparative study with this type of mould.

5. CONCLUSIONS

Amongst the fungicides conventionally used in a tannery and studied in this work, 2-(thiocyanomethylthio)-1,3-benzothiazole (TCMTB) shows the highest antifungal capacity against the tested fungi (*Aspergillus niger* and *Trichoderma harzianum*), notably against *Aspergillus niger*. The mixture of phenolic compounds is not adequate against *Trichoderma harzianum* at normal application offers and *Aspergillus niger* is also resistant to the action of the mixture when this is applied at low offers.

Low offers of two of the three alternative fungicides studied diiodomethyl-p-tolylsulfone (DIMPTS) and 3-iodo-2-propynyl-N-butylcarbamate (IPBC) confer satisfactory mould growth resistance to the treated wet-blue leather samples as shown by the values of sample surface growth and inhibition zone obtained. As far as TBZ is concerned, the commercial formulation tested was inefficient against the selected fungi, at least at the lowest offers applied in the tests.

The results obtained confirm that diiodomethyl-p-tolylsulfone (DIMPTS) and 3-iodo-2-propynyl-N-butylcarbamate (IPBC) are good candidates as alternative fungicides to be used in the leather industry.

However, their potential application should be checked against a wider spectrum of fungi especially those isolated in tannery work. This constitutes the aim of the next study together with toxicity evaluation associated to such application.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation through the CTQ2009-08347 Project. The authors are indebted to Mr. George von Knorring for reviewing the English version of the manuscript.

(Received June 2011)



References

- Orlita, A., Microbial biodeterioration of leather and its control: a review, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2004, **53**, 157-163.
- Seguer, J., Beltrán, M., Rodríguez, F. J. *et al.*, Disminución de la toxicidad de las aguas residuales de un proceso de curtición en el que se ha utilizado TCMTB como protector de las pieles, *Proceedings 51 Congreso AQEIC*, Tortosa, abril 2002, pp. 101-109.
- Hauber, C., Microbicide applications in the leather industry, En: Paulus, W. (Ed.), *Directory of microbicides for the protection of materials*, Springer, Berlin, pp. 317-324 (2005).
- Hauber, C., The addition of fungicides in chrome tannage and their penetration absorption and distribution in the wet-blue, *World Leather*, May 1997, p. 75.
- Hauber, Fungicides, www.leathermag.com Published 16 August 2008.
- Russel, Pinchuck and Cooper, Fungicide Evaluation for the protection of wet-blue hides. *J. Soc. Leather Technol. Chem.*, 1985, **69**, 135-140.

7. Bugby, A., The practical evaluation of fungicides. *J. Soc. Leather Technol. Chem.*, 1987, **71**, 138-141.
8. Yapici, B. M. and Karaboz, I., The effect of two anti-fungal compounds on the growth of molds that frequently appear on tanned leather. *J. Amer. Leather Chem. Ass.*, 1997, **92**, 38-45.
9. Padoan, K., New generation of fungicides for leather preservation, Proceedings del II Eurocongress of the International Union of Leather Technologists and Chemists Societies (IULTCS), mayo 2006, Estambul.
10. Galloway, Fungicides for treating wet-blue hides. *J. Soc. Leather Technol. Chem.*, 1974, **58**, 67.
11. Bayramoglu, E. E., Research on the effects of TCMTB and N-OITZ based fungicides used in Leather Industry, Proceedings del II Eurocongress of the International Union of Leather Technologists and Chemists Societies (IULTCS), mayo 2006, Istanbul.
12. Adminis, U., Huynh, C. and Money, C.A., The need for improved fungicides for wet-blue. *J. Soc. Leather Technol. Chem.*, 2001, **86**, 118-121.
13. Bayramoglu, E., Unique Biocide for the leather industry; Essential Oil of Oregano. *J. Amer. Leather Chem. Ass.*, 2007, **102**(11), 347-351.
14. Seguer, J. and Beltrán, M^a T., Productos biocidas notificados en la Directiva 98/8/CE en el sector de curtición, Proceedings 52 Congreso AQEIC, Lorca, abril 2003, pp. 37-47.
15. Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de febrero de 1998, Official Journal of the European Communities de 24 de abril de 1998, pp. L123/1–L123/63.
16. Jennifer M. Andrews, Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, **48**, Suppl. S1, 5-16.
17. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) CMI, 6, 509-515.
18. Standard Test Method for Mould Growth Resistance of Wet-Blue; ASTM D 4576-01.



ALC Ltd Tannery projects from incremental improvement of existing plants and process to total design & build of new factories from scratch.

www.tanneryproject.com

www.leatherconsultant.co.uk

DETERMINATION OF TCMTB AND OTHER FUNGICIDES IN LEATHER

by

J. FONT, M. REYES,* S. CUADROS, A. BACARDIT AND A. MARSAL^a

Escola d'Enginyeria d'Igualada, Universitat Politècnica de Catalunya,
PLAÇA DEL REI 15, 08700 IGUALADA, SPAIN

^aIQAC-CSIC, DEPARTMENT OF CHEMICAL AND SURFACTANTS TECHNOLOGY,
J. GIRONA, 18-26, 08034 BARCELONA, SPAIN

ABSTRACT

The new ISO 13365:2011 develops a test method for the determination of the content of the preservative agents 2-(thiocyanomethylthio)-benzothiazole (TCMTB), 4-chloro-3-methylphenol (PCMC), 2-phenylphenol (OPP) and 2-Octyl-3(2H)-isothiazolone (OIT) in leather by liquid chromatography. The simultaneous determination of the fungicides TCMTB, PCMC, OPP, OIT, and also 2-mercaptobenzothiazol (MBT) and 3-iodo-2-propynyl-butylcarbamate (IPBC) in leather samples was carried out by liquid chromatography (HPLC) with diode array ultraviolet detection. The sample preparation and extraction step was performed following the new ISO 13365 Standard. The mobile phase was 0.1% formic acid in water (A) : 0.1% formic acid in acetonitrile (B). Gradient: 60% B, 6 min isocratic, then linear to 95% B in 9 min. The chromatographic detection introduced only a minor change with respect to the Standard: a photo diode array detector was used instead of a single wavelength ultraviolet one, thereby improving the reliability of the identifications and the sensitivity of the quantification. It has been ensured that 2,4,6-trichlorophenol (TCP) and pentachlorophenol (PCP) not interfere in the determination. The leather fortifications of 30 and 300 mg/kg yielded average TCMTB recoveries of 94% and 99%, respectively. The recoveries of the other fungicides were similar. The targeted fungicides were determined in 40 samples of commercial leather. Residues of TCMTB were found in 90% of samples.

In summary, the new ISO 13365:2011 Standard provides a quick and reliable method not only for the determination of the four molecules that are within the scope of the Standard but also for other fungicides such as IPBC and MBT.

RESUMEN

La nueva norma ISO 13365:2011 desarrolla un método analítico para la determinación del contenido de los agentes conservantes 2-(tiocianometiltio)-benzotiazol (TCMTB), 4-cloro-3-metilfenol (PCMC), 2-fenilfenol (OPP) y 2-octil-3(2H)-isotiazolona (OIT) en cuero por cromatografía líquida. La determinación simultánea de los fungicidas TCMTB, PCMC, OPP, OIT, y también de 2-mercaptobenzotiazol (MBT) y 3-yodo-2-propinil-butilo (IPBC) en muestras de piel se llevó a cabo mediante cromatografía líquida (HPLC) con detector ultravioleta de fotodiodos (PDA). La preparación de la muestra y el proceso de extracción se realizaron siguiendo la norma ISO 13365. La fase móvil consistió en agua con un 0.1% de ácido fórmico (A) y acetonitrilo con un 0.1% de ácido fórmico (B). La fase inicial tiene un 60% de B isocrático durante 6 minutos, entonces se inicia un gradiente lineal hasta el 95% de B en 9 min. En la detección cromatográfica se introdujo un pequeño cambio en relación con la norma. Se utilizó un detector de fotodiodos en lugar de un detector de longitud de onda fija para mejorar la fiabilidad de las identificaciones y la sensibilidad de la cuantificación.

Se ha comprobado que el 2,4,6-triclorofenol (TCP) y el pentaclorofenol (PCP) no interfieren en la determinación. Las fortificaciones de 30 y 300 mg/kg en cuero produjeron unas recuperaciones medias de TCMTB del 94% y 99%, respectivamente. Las recuperaciones de los otros fungicidas fueron similares. Los fungicidas investigados se determinaron en 40 muestras de cueros del mercado. En el 90% de las muestras se encontraron residuos de TCMTB.

En resumen, la nueva norma ISO 13365:2011 proporciona un método rápido y fiable, no sólo para la determinación de las cuatro moléculas incluidas en el ámbito de aplicación de la norma, sino también para otros fungicidas como el IPBC y el MBT.

*Corresponding author, e-mail: m.reyes.reyes@eei.upc.edu.

Manuscript received March 29, 2011, accepted for publication May 24, 2011

INTRODUCTION

Fungicides are the substances used to inhibit the growth of fungi that cause the degradation of leather. Fungicides used in the leather industry fall mainly into two broad chemical families: phenolics, (which include PCMC and OPP) and heterocyclics (which include TCMTB, OIT, and MBT). Figures 1 to 6 present the chemical structure and the UV spectrum of the fungicides studied in this paper. Before the decade of 1990's, pentachlorophenol (PCP) was the most employed fungicide in the leather industry. Since the withdrawal of PCP, TCMTB became the most widely used substance for controlling the fungi in the leather industry.

Determination of PCP and organochlorine pesticides in skins and leather is routinely carried out by gas chromatography (GC).^{1,2} Determination of TCMTB is preferred by liquid chromatography (HPLC) rather than by GC for avoiding the possibility of thermal decomposition.^{3,4} HPLC with careful calibration provides well reproducible results for quantitative analysis.⁵ The first trials of TCMTB determination in leather were carried out in 1978 by subjecting treated wet blue to eight hours Soxhlet extraction with dichloromethane.⁶ A poor recovery of 50% was obtained. Fowler et al. proposed a combined sonication and Soxhlet extraction with dichloromethane in 1987.⁷ The efficiency of the extraction increased when the moisture of the sample was lowered. The determination stage was carried out with adsorption-HPLC eluting with non-polar solvents like hexane or dichloromethane. However, low recoveries were still obtained. Tomaselli et al, in 1991, introduced the chromatographic method of reversed phase HPLC eluting with acetonitrile/ water acidified with 0.1% H₃PO₄ for the analysis of fungicides.⁸

The ISO 13365:2011 Standard is based on the knowledge and experience of the *Lederinstitut Gerberschule* of Reutlingen on fungicide analysis. The ground leather sample is extracted with a mixture water/acetonitrile with the aid of ultrasonic waves for one hour. The filtered extract is analysed by reversed phase HPLC with UV detection.⁹ With this method, the efficiency of the extraction of TCMTB from leather is considerably improved. This is mainly due to using samples of reduced humidity content. Wet blue and wet white leather are dried prior to grinding and extracting. The extraction of leather with a solvent miscible with water such as methanol or acetonitrile has the added advantage that the phase change for its injection in reversed phase chromatography is not necessary. Acetonitrile is preferred to methanol since acetonitrile allows the detection of molecules at a wavelength as short as 190 nm. This is convenient for molecules such as PCMC, OPP and IPBC that have the maximum absorptivity at short wavelengths.

Unlike the solvent proposed in the ISO Standard, a slightly acidified mobile phase was used in this work. Given that TCMTB is more stable in acidic conditions and given that

phenolic preservatives are determined simultaneously, the use of acetonitrile and water at a slightly acidic condition is advisable. We used acetonitrile with 0.1% formic acid, and water with the same % of formic acid instead of acetonitrile and water. Unpublished work performed in our laboratory using acetonitrile and water acidified with trifluoroacetic acid gave results very similar to those obtained when using these eluents acidified with formic acid. However, formic acid has the advantage of being a suitable reagent also for HPLC - Mass Detection systems.

No method for simultaneous determination of more than four different fungicides in leather has been reported. In fact, very little is known about the residual contents of fungicides in hides and leather. Hauber and Germann have indicated that the TCMTB content of wet blue should be 250 ppm for minimum level of fungicidal protection, compared to 580/280 ppm for PCMC/OPP and 80 ppm for OIT.^{10,11} A greater protection requires increased concentration of fungicide.

The aim of this paper is to describe a rapid and simple method for the simultaneous determination of TCMTB and seven other fungicides in hides and leather and to evaluate the parameters of its validation. This work deals with the application of easily available techniques such as HPLC with photo diode array (PDA) detection and ultrasounds assisted extraction.

This HPLC method is adapted from the Standard ISO 13365. It is suitable for the four mostly used fungicides in the leather industry and could also be employed for other molecules that are currently being investigated. The sensitivity and selectivity of the method can be significantly improved compared to UV detection at a fixed wavelength by the selection of a specific optimal detection wavelength for each molecule. The use of a PDA detector enables us to obtain as many chromatograms (channels) as different fungicides under study for every injected sample. Each fungicide is detected at its own optimal wavelength.

Figures 1 to 6 show the UV spectra of the analytes. The different fungicides have absorption maximums at different wavelengths. The proposed detection wavelengths were the following: for IPBC, 193 nm; for MBT, 324 nm; for OIT, 279 nm; for TCP, 205 nm; for PCP, 214 nm; for OPP, 201 and 246 nm; for PCMC, 201 and 228 nm and for TCMTB 223 and 280 nm.

EXPERIMENTAL

Instrumentation

HPLC-PDA system: Alliance 2695 Separation Module (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA) fitted with a 2998 PDA Detector. A Mediterranean Sea₁₈ 15 x 0.46 cm 3 μ m column (Teknokroma, Barcelona, Spain) packed with C18 reversed-phase was used. UV scanning detection was

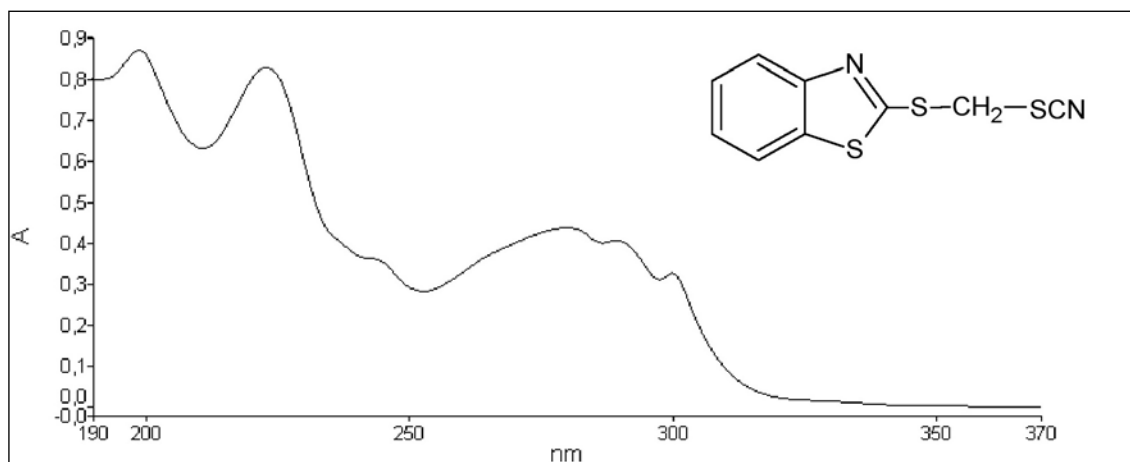


Figure 1. Structure and UV spectrum of TCMTB

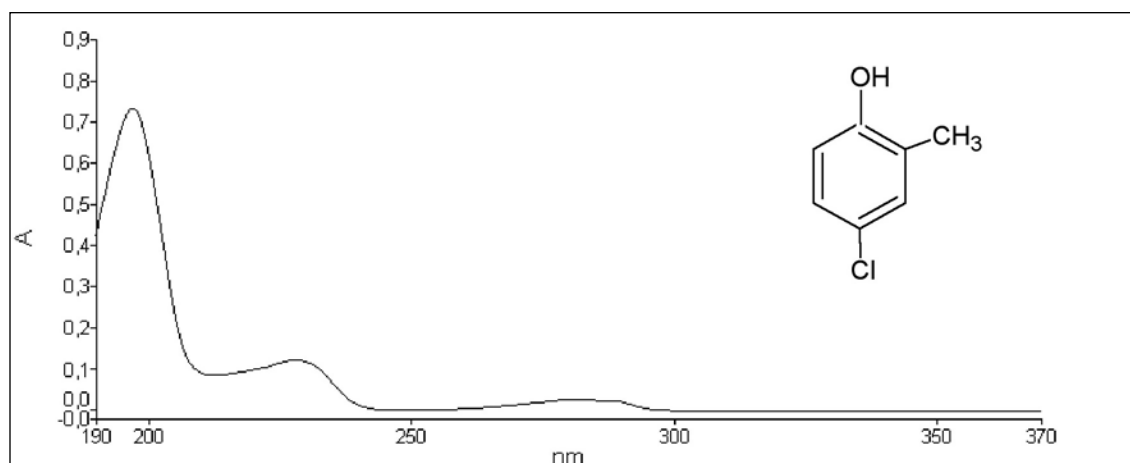


Figure 2. Structure and UV spectrum of PCMC

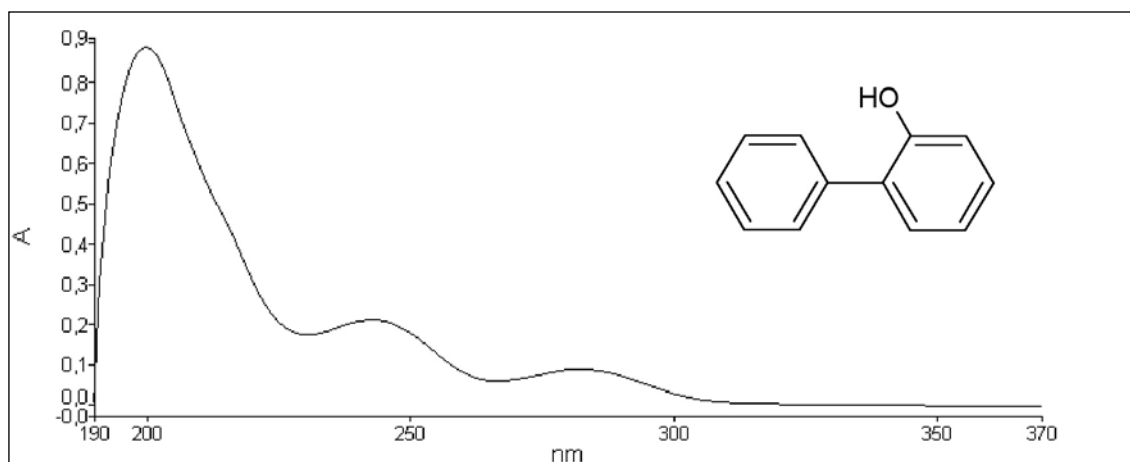
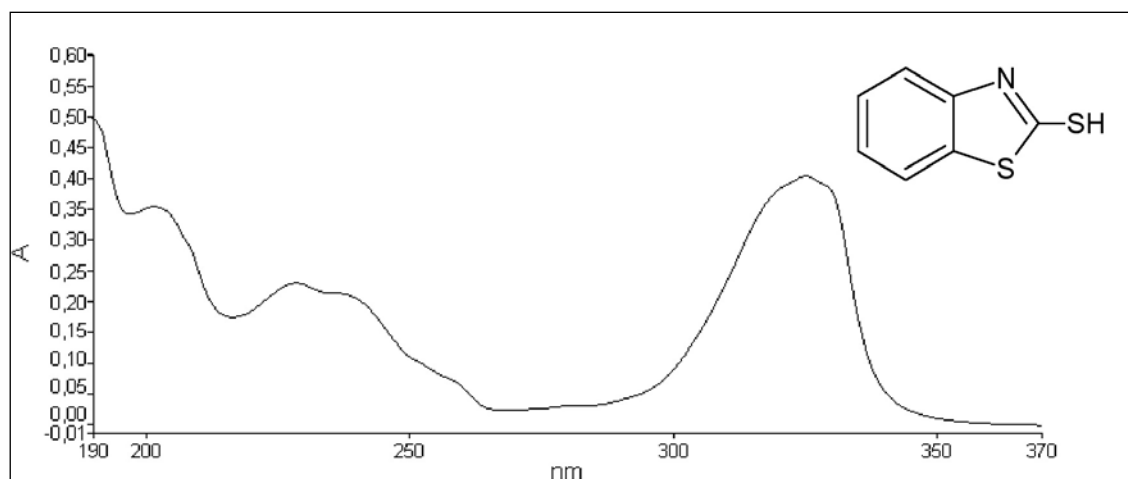
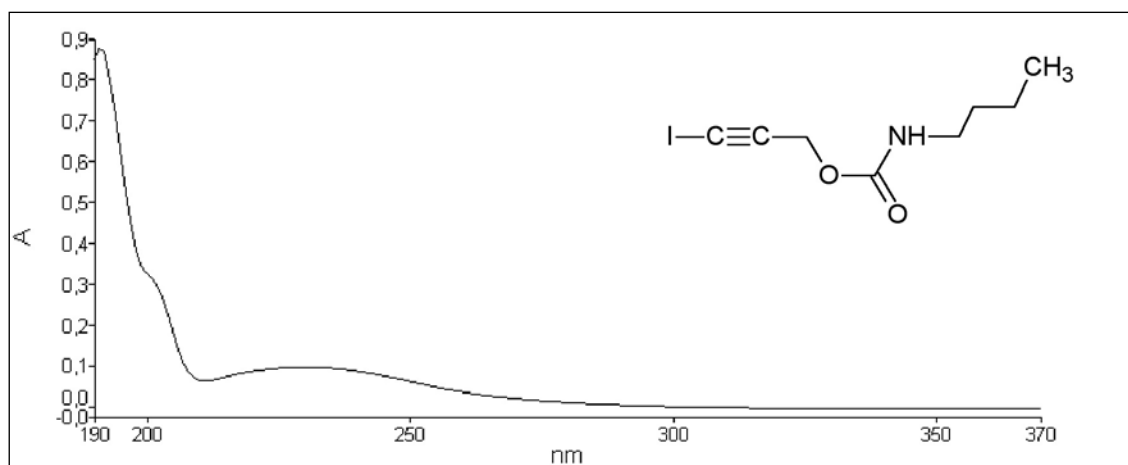
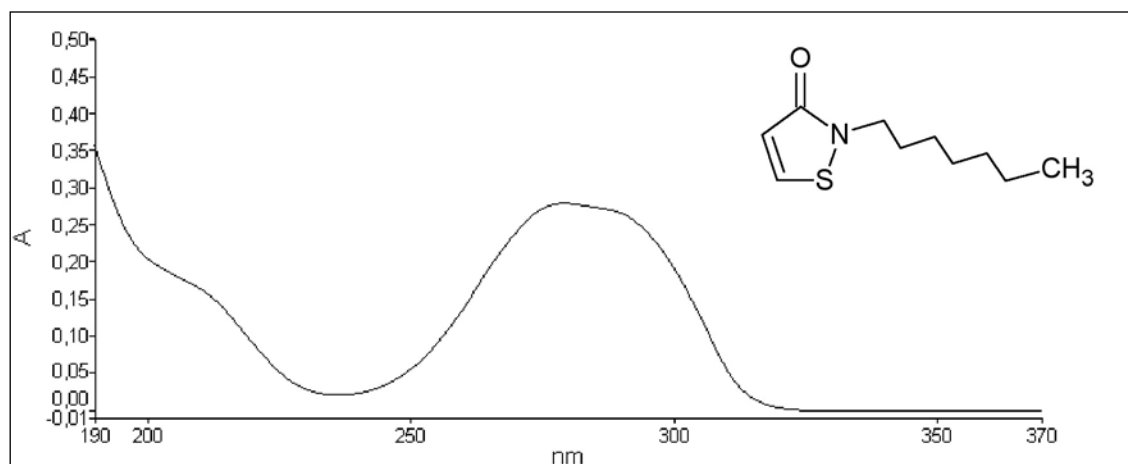


Figure 3. Structure and UV spectrum of OPP



performed between 190 and 380 nm. The mobile phase was 0.1% formic acid in water (A) : 0.1% formic acid in acetonitrile (B). Gradient: 60% B, 6 min isocratic, then programmed linear to 95% B in 9 min. Flow was 0.9 mL/min. The oven temperature was held at 30°C. A 20- μ L volume of analytical solution was injected. A smaller volume (10- μ L or 15- μ L) was chosen for the injection of the samples in which fungicides were detected at high concentrations.

Materials

Formic acid for mass spectroscopy, ~98% was obtained from Fluka. Analytical standards of fungicides were obtained from Supelco (TCMTB, PCMC), from Fluka (OIT, OPP, TCP), and from Aldrich (IPBC, PCP). 0.45 μ m PVDF membrane filters were supplied by Micron Analítica (Madrid, Spain). The solvent acetonitrile was of HPLC-gradient grade from Panreac (Spain). Water used in the mobile phase was Milli-Q ultrapure water.

Samples

Forty commercial samples of leather from different countries were analyzed. Twenty-six were finished and 14 were semi-processed (wet-blue and wet white). Samples were collected within the period 2009-2011. Before the analyses, all the samples were conditioned in ISO 2419 standard atmosphere.

Procedure

1.000 \pm 0.010 g of ground leather is weighed in a 50 mL screw top bottle. 20 mL of acetonitrile are transferred to the leather. The leather sample is extracted in an ultrasonic bath for 1 hour \pm 5 min at room temperature. During extraction the temperature in the mixture increases to about 35°C. Thereafter, a part of the extract is filtered through a 0.45 μ m PVDF membrane filter into a suitable vial. The filtrate is analyzed by HPLC. Analyte peak identity is determined by matching the retention time with that obtained from the injection of analytical standards, and confirmed by diode array detection, which provides an UV spectrum for each compound peak for comparison with that obtained from the analytical standards of the fungicides.

Detected preservatives are quantified using the calibration plots prepared previously with known solutions of analytical standards of the fungicides.

RESULTS AND DISCUSSION

All the preservatives investigated were successfully separated under the detailed experimental conditions. The resolution between peaks was very good. The presence of 2,4,6-trichlorophenol (TCP) and pentachlorophenol (PCP) did not interfere in the determination. Figure 7 is an example of the chromatographic separation. The quantitative method was validated in terms of linearity, precision, sensitivity and recovery to determine the method quality and reliability.

Limits of detection and quantification

Limits of detection (LOD), defined for a signal-to-noise ratio of 3 (S/N=3), were estimated for the different fungicides. The limits of quantification (LOQ), defined for a signal-to-noise ratio of 10 (S/N=10), were also estimated. The LODs of TCMTB, PCMC and OPP were measured at more than one wavelength. Results are given in Table 1. The largest analyte signal does not necessarily imply most sensitivity since a little baseline noise is also needed. The UV spectrum of TCMTB shows an absorption maximum at 223 nm. However, data in table 1 show that the most sensitive detection wavelength for TCMTB is 275 nm.

For OPP the most sensitive detection wavelength is 243 nm. For PCMC, the LOD at 197 nm resulted in an approximately 3 fold improvement in sensitivity when compared to the 228 nm detection. The lowest LOD obtained was for MBT and the highest was for IPBC, as expected.

These results show that the sensitivity of the method described in this paper allows the quantification of the fungicides in the range of concentrations used in the leather industry.

Linearity, recovery and precision

Five standards within the range 2 to 40 mg/L of OCP, OIT, PCMC, PCP and TCMTB were prepared. For MBT, the range of the standards was 0.5 – 20 mg/L and for IPBC was 5 – 50 mg/L. The peak areas were measured and calibration graphs were plotted on the linear regression analysis without forcing the curve through the zero. Linearity was verified over the entire working range. Correlation coefficients were all higher than 0.999.

The recovery study was performed for each fungicide at two levels of concentration with three replicates per level. The levels were selected to reproduce the concentration ranges encountered in real samples according to Hauber and Germann data.^{10,11}

A sample of fresh Catalan calf hide was tanned to wet blue without using any preservative. Thereafter, it was analyzed to verify that it did not contain fungicides. This blank wet-blue leather sample was dried at 25°C, cut into small pieces, and ground in a cutter mill.

Portions of 1 g were transferred to 50 mL screw top bottles and were spiked with a standard solution of fungicide in acetonitrile. The solvent was allowed to evaporate at 23°C for 24 hours. Then, the concentration of fungicide was determined. This process was repeated three times for each fungicide. The average recoveries were greater than 84% in all cases, as shown in Table 2. For TCMTB, the recovery of the method was 99% at the level of concentration of 300 mg/kg.

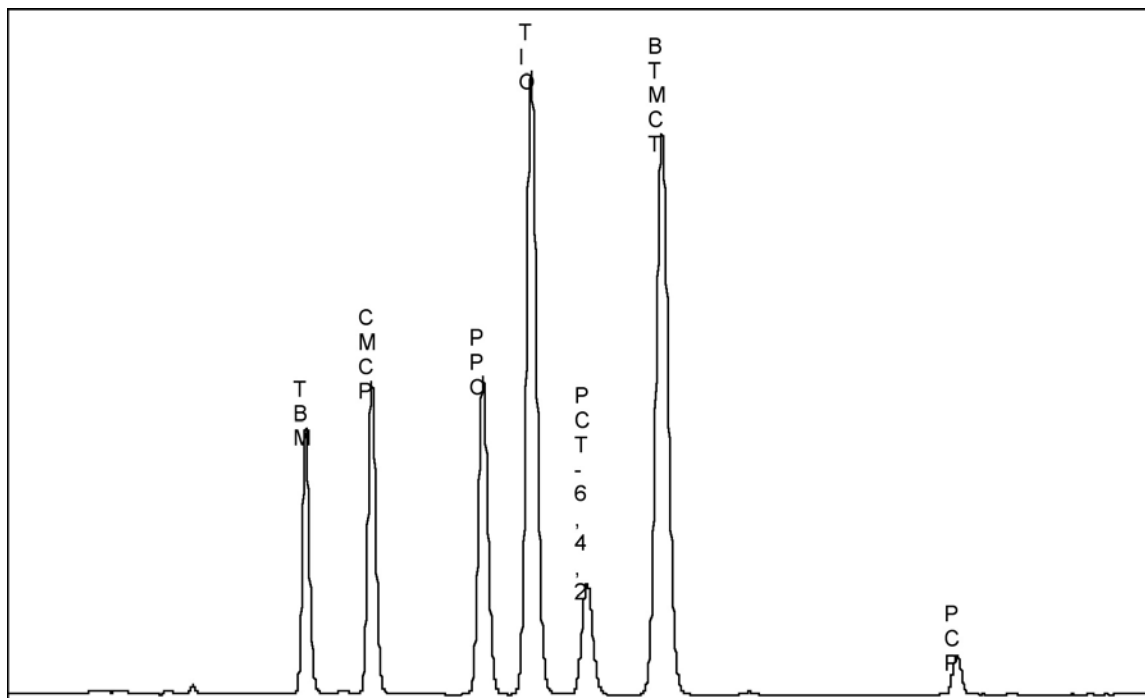


Figure 7. HPLC chromatogram of a standard of seven preservatives at concentrations ranging from 5 to 10 mg/L. See Experimental Section for chromatographic details. Wavelength of detection was 270 nm.

TABLE 1
Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 8 fungicides

Fungicide	Wavelength (nm)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)
TCMTB	223	1.7	5.7
	275	1.2	4.0
MBT	324	0.06	0.2
PCMC	197	0.71	2.4
	201	1.3	4.3
	228	2.0	6.7
OPP	201	2.2	7.3
	243	1.7	5.7
OIT	279	0.46	1.5
TCP	203	1.7	5.7
PCP	214	0.39	1.3
IPBC	193	17	57

TABLE 2
Recoveries of 6 fungicides at two levels of concentration

Fungicide	Wavelength	Level ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%)	% RSD (n=3)
OIT	279 nm	30	84	± 1.7
		350	91	± 4.6
OPP	201 nm	50	92	± 0.8
		450	96	± 0.8
OPP	246 nm	50	95	± 0.4
		450	96	± 0.3
IPBC	193 nm	130	98	± 5.0
		300	88	± 3.5
MBT	324 nm	20	88	± 1.8
		250	88	± 1.6
PCMC	201 nm	70	91	± 0.1
		600	98	± 1.1
PCMC	228 nm	70	93	± 0.5
		600	96	± 0.3
TCMTB	223 nm	30	94	± 5.0
		300	99	± 0.6

The intraday precision of the method was evaluated by calculating the relative standard deviation (RSD) of replicated analysis (n=3) of the recovery study. RSD values were lower than $\pm 5\%$. Results are included in Table 2.

Selection of wavelength of detection

Three criteria must be borne in mind while choosing the wavelength detection: sensitivity, precision, and selectivity. The sensitivity is greater at shorter wavelengths, except for MBT and OIT. However, the precision of the analyses is better at longer wavelengths. For example, in the analysis of a commercial leather sample, the Relative Standard Deviation of eight determinations of OPP at 201 nm was $\pm 3.8\%$ while at 246 nm was only $\pm 1.5\%$.

Finally, the proper selection of the wavelength improves the selectivity of the chromatography. The chromatograms of some finished leather samples are complex, richer in peaks than the chromatograms from wet blue samples. Peaks of unknown interfering substances in close proximity to retention time of the fungicide of interest may be present in some samples. The correct integration of the un-resolved peaks could be difficult. The selection of a wavelength where the

difference in sensitivity between the fungicide and the interfering substance is maximal improves the quality of the peak integration in the chromatography.

Analysis of commercial samples

The six targeted fungicides were determined in 40 commercial samples of leather. All the samples contained residues of at least one of the determined fungicides. 40% of the samples contained two or more different molecules. Among fungicide residues identified, TCMTB was detected in 90% of the hides, PCMC in 35%, OPP in 25%, and MBT and OIT in 8%. As expected, IPBC was not detected in any sample. TCMTB was present in the ten Spanish wet-blue hides that were analyzed. One of these samples also contained 154 mg/kg of MBT. Concentrations ranging from 440 to 540 mg/kg of TCMTB were found in Spanish wet-blue hides for exportation. For short time conservation wet-blue, concentrations of TCMTB ranged from 253 to 354 mg/kg. All the values are expressed in weight basis of samples conditioned in the standard atmosphere.

Most samples that contained PCMC also contained OPP. The concentrations detected of the two fungicides varied from 8 to

680 mg/kg and from 8 to 480 mg/kg, respectively. The concentrations detected of MBT and OIT ranged from 4 to 154 mg/kg and from 44 to 230 mg/kg, respectively.

CONCLUSIONS

The HPLC allows the rapid, sensitive and highly specific determination of fungicide preservatives in leather. Sample preparation of ISO 13365 Standard is as simple as 1-hour extraction, filtration, and injection. The UV spectrum from PDA detection allows the reliable confirmation of analyte identity. The selection of wavelength detection is specific for each fungicide. The study shows that, in general, recovery and precision are better at long UV wavelengths (225-280 nm). Sensitivity is commonly greater at shorter wavelengths (193-225 nm), but noise and risk of interferences are enhanced. The results of the analyses of real samples show that TCMTB is the most widely used molecule for protecting leather from fungi attack during storage.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Ms. Núria Muñoz for her contribution in the analyses of real commercial samples and in the repeatability tests and Mr. George von Knorring for reviewing the English version of the manuscript. The authors would also like to acknowledge the Spanish Ministry of Science and Innovation for the funding obtained through the CTQ 2009-08347 Project.

REFERENCES

1. J. Font, A. Marsal. *Journal of Chromatography A*, **811**, 256, 1998.
2. J.Font, E.Poch. *Bol. AQEIC*, **42**, 149 (1991).
3. N. Voulvoulis, M.D. Scrimshaw, J.N. Lester. *Chemosphere*, **38**, 3503, 1999.
4. S. T. Nawrocki, K. D. Drake, C. F. Watson, G. D. Foster, and K. J. Maier. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **48**, 344, 2005.
5. L. Muthusubramanian, R.B. Mitra, V.S. Sundara Rao *J. Soc.Leath.Tech.Ch.* **82**, 22, 1998.
6. J. Van Deren, E.F.Weiss. *J.Am.Leather.Chem.As.* **73**, 498, 1978.
7. W. M. Fowler, A.E.Russell, I.H.Kruger, S.C.Pinchuck. *J. Soc. Leath. Tech. Ch.* **71**, 100, 1987.
8. M. Tommaselli, A. Cozzolino, *Cuoio Pelli Mat. Concianti*, **67**, 221,1991.
9. http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=53718.
10. C.Hauber, H.P.Germann. *World Leather* **10**, 75, 1997.
11. C.Hauber. Microbicide applications in the leather industry in *Directory of Microbicides for the Protection of Materials*. W. Paulus. Springer, 317-324, 2004.

Alternative Fungicides for the Leather Industry: Application in Various Processes

SARA CUADROS¹, M^a ÀNGELS MANRESA³, JOAQUIM FONT², M^a ELENA BAUTISTA¹,
RITA PUIG² and AGUSTÍ MARSAL¹

¹ IQAC-CSIC, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Departamento de Tecnología Química y Tensioactivos, Jordi-Girona 18-26, Barcelona, Spain

² Escola d'Enginyeria d'Igualada, EEI, Universitat Politècnica de Catalunya, (UPC), Plaza del Rey 15, Igualada, Spain

³ Facultat de Farmàcia, Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona (UB), Diagonal 27-31; Barcelona, Spain

Abstract

Increasingly stringent environmental legislation and indispensable use of fungicides in the tanning industry obliges tanners to adapt their processes to alternative technologies with lower environmental impact, including the search for new fungicide systems that comply with those rules.

The fungicidal capacities of alternative compounds diiodomethyl p-tolylsulfone (DIMPTS), 3-iodo-2-propynyl N-butylcarbamate (IPBC) and thiabendazole / 2-thiazol-4-yl-1H-benzo imidazole (TBZ) were compared to those of conventional fungicides, 2-(thiocyanomethylthio)-1,3-benzothiazole (TCMTB) and the mixture of phenolic compounds). This fungicidal capacity was evaluated against different strains of fungi in different processes. Fungicides were applied in the chrome tanning process, fatliquoring of hides tanned with vegetable extracts and a preservative pickling process. Further studies consisted of a microbiological control samples inoculated with fungi common in tannery, determination of the fungicide content on the skin, and a toxicity study of process wastewater.

The results obtained in an earlier work and the higher antifungal capacity of DIMPTS and IPBC in the different processes, supported the possibility of using them in the leather sector.

The skins produced using alternative fungicides showed no stains or other defects, and in relation to the environmental impact, toxicity from wastewater was lower in the case of the alternative products against those commonly used.

1. INTRODUCTION

In tanneries, the addition of an effective fungicide is necessary to avoid fungal attack after manufacturing operations such as pickling, tanning, dyeing and fatliquoring. Hide attacked by fungi is shown by permanent stains and impaired physical properties because of collagen degradation.¹

Strict environmental legislation obliges tanners to adapt their processes to alternative technologies in order to minimize the environmental impact. This includes the search for new fungicide compounds that are environmentally friendly.

Earlier studies²⁻⁶ have shown that there are compounds used as fungicides that could have potential applications in the leather industry in an attempt to provide satisfactory antifungal protection and lessen environmental impact.

In an earlier work,⁷ fungicides conventionally used in the tannery were compared to alternative compounds. It was concluded that two of them: (diiodomethyl-p-tolylsulfone, DIMPTS and 3-iodoprop-2-ynyl-N-butylcarbamate, IPBC) conferred satisfactory mould growth resistance to the treated wet-blue leather samples and, hence, these compounds were considered satisfactory for use in the leather industry. The compounds studied in this work were selected in accordance with the 98/8/EC Directive.^{8,9} Further

studies of the fungicides against a wider spectrum of fungi and its application in different steps of the manufacturing process are necessary to confirm their potential use in the leather industry.

2. AIM OF THE WORK

This work is focused on the search for new fungicide compounds of higher efficiency against a wide range of fungi. These compounds should be less toxic and should have a lower environmental impact than conventional compounds used in the leather industry.

This work seeks to evaluate the fungicidal capacity of the selected compounds (registered in the 98/8/EC Directive) against different strains of fungi and in different steps of the manufacturing process. The fungicidal capacity of the selected compounds will be compared with that of the conventionally used fungicides such as TCMTB and a mixture of phenolic compounds.

The selected fungicides will be employed in chrome tanning hides using drums at laboratory scale. Subsequent analyses will consist of microbiological control of fungal growth on the wet-blue hides inoculated with different strains. The stratigraphic distribution of fungicides in the hide thickness will be determined to evaluate penetration. The toxicity level of process wastewaters will also be checked.

* Authors for correspondence: ¹ammeco@iiqab.csic.es

²joaquim.font@eei.upc.edu

Furthermore, the effect of the selected fungicides added to other two processes also with hides will be studied. These two processes are:

- i) The fatliquoring process of hides tanned with vegetable extracts.
- ii) A preservative pickling process.

Microbiological control of fungal growth will be carried out for both processes. Fungi strains provided by the Spanish Type Culture Collection (CECT) from the University of Valencia and other strains isolated in tannery will be used in the analyses of fungal growth. This will help to evaluate the proposed options as alternative fungicides for the leather sector.

3. EXPERIMENTAL PROCEDURES

3.1 Materials

The fungicidal capacity of five compounds, two of which are conventionally used in the tanning industry and three as alternatives in this sector, was evaluated. Table I shows the list of the studied compounds (registered in the 98/8/EC Directive).⁹

The fungicidal capacity of the selected fungicides was evaluated against the growth of five fungi. Two of

them, *Aspergillus niger* and *Trichoderma harzianum*, are described in literature as responsible for damage during leather manufacture, were supplied by the Spanish Type Culture Collection (CECT) from the University of Valencia. The strains were received lyophilized from CECT and were reconstituted in a suitable agar nutrient medium until the production of viable spores. The other three strains, identified as *LL01*, *QF01* and *QF02*, were obtained from tannery contaminations and were reconstituted in a suitable nutrient medium for subsequent identification (see 3.2).

A suspension of spores of each strain was prepared with 85% saline solution. Thereafter, the counting of spores was carried out by two methods: under the microscope and the plate count method to control the amount of spores per mL to inoculate.

The nutrient media used for the growth of fungi on plates were sabouraud dextrose agar (Oxoid, Basingstoke, UK) and potato dextrose agar (Oxoid, Basingstoke, UK).

3.2 Isolation and identification of fungi from contaminated hides

Fungi that were responsible for hide contamination in the tannery were extracted and identified (Image 1).



Image 1. Appearance of the three isolated fungal strains. From left to right: *LL01*, *QF01*, *QF02*

TABLE I Fungicides used in this study		
Fungicides conventionally used in tannery	TCMTB	2-(thiocyanomethylthio)-1,3-benzothiazole (~ 30% active ingredient) CAS 64441-45-8
	Mix of phenolic compounds	p-chlorometacresol + orthophenylphenol (~ 40% active ingredient) CAS; PCMC 59-50-7; OPP 90-43-7
Alternative fungicides	DIMPTS	diiodomethyl-p-tolylsulfone (~ 40% active ingredient) CAS 20018-09-1
	IPBC	3-iodo-2-propynyl-N-butylcarbamate (~ 30% active ingredient) CAS 55406-53-6
	TBZ	thiabendazole (~ 60% active ingredient) CAS 148-79-8

TABLE II
Wet-blue tanning process

60% H ₂ O	
4% NaCl	
4% chromium salt 33% basicity	Drum 60'
0.1% fungicide (1:4) (hot water)	Drum 60'
4% chromium salt 33% basicity	Drum 3 hrs
1% sodium formate	Drum 3 hrs
<i>Rest overnight</i>	
pH (2.8-3)	
1-1.5% sodium hydrogen carbonate	Drum 90'
pH (3.5-4)	
0.1% fungicide (1:4) (hot water)	Drum 60'
Drain off	
100% H ₂ O	Drum 15'
Drain off	
All offers are based on pelt weight	

Samples of contaminated hides were shaken for 24 hours with Ringer solution in order to extract spores. Thereafter, some drops of the solutions were inoculated on to the nutrient medium of potato dextrose agar and fungal growth was observed. The different types of strains observed were then separated and isolated. Samples of the fungal strains obtained were sent to the Spanish Type Culture Collection (CECT) at the University of Valencia for identification. The CECT identified fungi that caused hide contamination in the tannery as:

- LL01 – *Trichoderma harzianum*
- QF01 – *Penicillium spinulosum*
- QF02 – *Penicillium decumbens*

Given that the behaviour of the species of *Trichoderma harzianum* isolated from the tannery – with a higher resistance to fungicides – will probably be different from that supplied by the Spanish Type Culture Collection (CECT), both species of *Trichoderma harzianum* were used.

3.3 Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Minimum inhibitory concentration (MIC) is defined as the lowest concentration (expressed as µg/mL) of an antimicrobial that will inhibit the visible growth of a microorganism after an incubation period. Each fungicide has a specific MIC for each different fungus.¹⁰

MIC was determined in accordance with the ASTM D 4576-01 Standard.¹² Several dilutions at concentrations ranging from 10240µg/mL to 0.078µg/mL of the fungicides were prepared and the dilution that inhibits fungal growth was taken as the minimum inhibitory concentration.¹¹

Given that the MICs of the selected fungicides for fungi supplied by the CECT were evaluated in an earlier work,⁷ only the MICs for fungi isolated in the tannery were determined in this study. The results obtained in the previous work are also included in this paper.

3.4 Application of fungicides in three processes: wet-blue tanning process, fatliquoring process of vegetable leather and preservative pickling process

Bellies of 32kg hides from France, were used in all the processes, which were carried out in laboratory drums.

Before subjecting the hides to the aforementioned processes, a sample of each hide was extracted with acetonitrile and the extract was analyzed by HPLC to confirm that the hides used in this work were free of fungicides employed in previous operations.

3.4.1 Wet-blue tanning process

A pickled belly was used as starting material and was divided into five equal parts. Each part was subjected to one of the five fungicides (Table I) and separately tanned in a different drum (Table II).

The analyses carried out to evaluate the application of fungicides in this process were:

- Microbiological control of fungal growth on the wet-blue hides
- Stratigraphic distribution of fungicides in the hide thickness
- Toxicity level of process wastewaters.

3.4.1.1 Control of fungal growth on wet-blue hides

The control of fungal growth of the five selected strains was carried out in triplicate for each tanned belly sample treated with a different fungicide. The control was performed following the ASTM D4576-01 Standard on sterile plates with potato dextrose agar culture medium.¹² A wet-blue sample without fungicide was used as control for comparison.

The mould growth resistance of the fungicide treated samples was tested against the five different strains: *Aspergillus niger* and *Trichoderma harzianum* (supplied by the CECT) and LL01, QF01 and QF02 (isolated from the tannery). Once treated in accordance with the recipe of Table II, the samples were placed in sterile plates surrounded by the culture medium. After solidification of the agar, one drop of the spore suspension (1x10⁵ spores/mL) of each selected mould was deposited directly on the sample and another drop on the culture medium as shown in Figure 1.

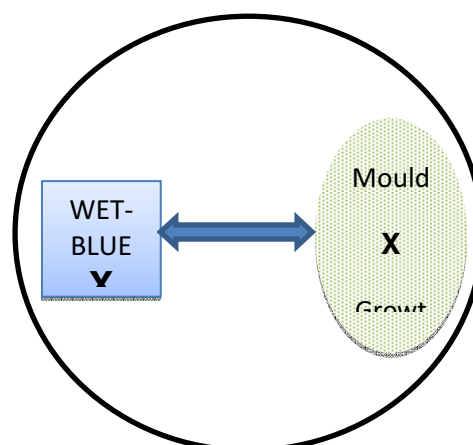


Figure 1. Sample with inoculum locations (X). Inhibition zone provided by the fungicide impregnated wet-blue sample.

The plates were stored in a humid atmosphere at 26°C and the control of fungal growth was performed weekly against the control sample. The easiest way to evaluate the results obtained in this study is to observe the images of fungal growth in the treated wet-blue samples placed on the plates. However, in accordance with the ASTM Standard,¹² the results of mould growth are expressed as the percentage of wet-blue surfaces covered by mould. We found that wet-blue samples with 0% of mould growth in their surface had mould growing around the samples. Therefore, for greater accuracy, we introduced another parameter called the 'inhibition zone' (Fig. 1), which can be defined as the area on an agar plate where growth of the mould is prevented by the fungicide placed on the wet-blue leather sample.

3.4.1.2 Stratigraphic distribution of fungicides in wet-blue leather

The wet-blue leather samples treated with fungicides were allowed to dry. Once dried, the samples were split into three layers (grain, intermediate and flesh) with a Fortuna Splitting Machine. The fungicide content was determined in each layer to evaluate fungicide penetration.

The leather corresponding to each layer was ground through a 2mm screen Wiley mill grinder Standard model 3 (Philadelphia, USA) and the powder obtained was analyzed for fungicide content by HPLC in accordance with the ISO/DIS 13365 Standard.¹³ First, the ground leather was extracted in an ultrasonic bath with a suitable solvent. Then, some of the extract was filtered and, finally, the filtrate was analyzed by HPLC. Acetonitrile was used for all fungicide extraction except for thiabendazole, for which, methanol was employed because of its low solubility in acetonitrile.

3.4.1.3 Toxicity of wet-blue tanning wastewaters

Toxicity level of the tanning process wastewaters for each fungicide was determined in accordance with the UNE EN ISO 11348-3:2009 Standard.¹⁴ The environmental impact of the alternative fungicides was compared with that of fungicides conventionally used in the tannery.

3.4.2 Fatliquoring process of hides tanned with vegetable extracts

A belly tanned with vegetable extracts was used as starting material and was divided into three equal parts. In this case, only two of the alternative fungicides (DIMPTS and IPBC) were considered and their antifungal capacity was compared with that of the TCMTB, the fungicide most widely used in the leather sector. The use of thiabendazole (TBZ) was discarded because of the poor results obtained to date.

Each of the three selected fungicides was applied to one part. Each part was separately fatliquored in a different drum (Table III).

The mixture of fatliquoring agents and the corresponding fungicide was emulsified at 55°C. Control of fungal growth was carried out on the resulting fatliquored vegetable leathers.

TABLE III
Fatliquoring of vegetable leathers

0.40% oxalic acid	
0.40% EDTA (disodium salt)	
150% H ₂ O	Drum 20'
100% H ₂ O	Drum 6'
Drain off	
70% H ₂ O	
4.30% sulfated natural triglycerides and synthetic additives	
1.00% sulphited fatliquoring agent	
0.05% Fungicide	
0.25% EDTA (disodium salt)	Drum 60'
0.17% oxalic acid	Drum 25'
Drain off	
160% H ₂ O	Drum 1'
Drain off	
All offers are based on tanned weight	

3.4.2.1 Control of fungal growth on fatliquored vegetable leathers

This analysis was carried out under the same conditions used for wet-blue hides (see 3.4.1.1). However, given that fatliquored vegetable leathers are kept in humid conditions for a maximum of 15 days, the control of fungal growth was performed for 20 days.

3.4.3 Preservative pickling process

A degreased pelt belly was used as starting material and was divided into three equal parts. Each of the three selected fungicides (TCMTB, DIMPTS and IPBC) was applied to one part. One sample of pickled belly without fungicide was taken as control. The preservative pickling process applied is shown in Table IV.

TABLE IV
Preservative pickling process

4.0% NaCl	Drum 20'
1.0% H ₂ SO ₄	Drum 90'
Drain off	
1.0% NaCl	
0.25% H ₂ SO ₄	
0.11% Fungicide	Drum 3 hrs
All offers are based on pelt weight	

3.4.3.1 Control of fungal growth on pickled bellies

The control of fungal growth was carried out on samples of pickled bellies obtained for each fungicide and under the conditions used for wet-blue leathers (see 3.4.1.1). The control of fungal growth was performed for 90 days.

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1 Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MICs)

Table V shows the results of the MICs of the selected fungicides against the strains of the fungi considered.

Fungicide	Strains submitted by CECT*		Isolated strains		
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	LL01	QF01	QF02
TCMTB	7.6	7.6	17	61	17
Mix of phenolics	62	124	122	122	122
DIMPTS	3.8	7.6	15.2	7.6	15.2
IPBC	0.8	3.9	3.8	3.8	3.8
TBZ	3.9	1.9	1.9	242	120

* Results of previous work ⁷

The fungicides proposed as alternatives show an antifungal capacity superior to that of compounds conventionally used in the leather sector not only against strains provided by the CECT but also against strains isolated from the tannery. These strains isolated from the tannery revealed a higher resistance to all fungicides. This is probably because these strains resisted the action of conventional fungicides possibly applied in the tanning process, *i.e.* these strains possess an 'acquired' resistance to these compounds.

4.2 Application of fungicides in three processes: wet-blue tanning process, fatliquoring process of vegetable leather and preservative pickling process

4.2.1 Wet-blue tanning process

4.2.1.1 Control of fungal growth on wet-blue hides

Table VI shows the results of surface growth and the inhibition zone in the different wet-blue samples after 90 days of testing. Figure 2 traces the evolution of the inhibition zone provided by the fungicide impregnated wet-blue sample against *QF01* up to 90 days. In these assays, the maximum inhibition zone, *i.e.* the maximum zone on the agar plate where no mould growth takes place, is 45mm. The higher the inhibition zone (those values approaching 45mm), the greater the protection provided by the fungicide (placed on the wet-blue leather sample).

As observed in Table VI, the antifungal protection provided by two of the alternative fungicides proposed (DIMPTS and IPBC) was noteworthy since no growth of the fungi was observed on the surface of the treated wet-blue samples. Moreover, the inhibition zone due to these two fungicides was higher than that due to the other fungicides. The conventional fungicides and the

thiabendazole do not possess sufficient antifungal capacity to avoid sample contamination. A greater resistance of the isolated fungi to the fungicides was confirmed.

Figure 2 shows that the inhibition zone provided by IPBC against the growth of *QF01* on the agar plate was greater than that of DIMPTS and that the inhibition zone was stabilized after 5 weeks of testing.

Image 2 is an example of growth control in samples where *QF01* was inoculated. The experiment was carried out in triplicate and each column corresponds to a different fungicide. It is noteworthy that the surface of wet-blue samples treated with DIMPTS and IPBC (fourth and fifth columns, respectively) were completely free of mould. Moreover, these fungicides prevented *QF01* from growing around the samples by creating an efficient inhibition halo.

4.2.1.2 Stratigraphic distribution of fungicides in wet-blue leather

Figure 3 shows the content of fungicide, expressed as a percentage, in each of the three layers (grain, intermediate and flesh) obtained after splitting wet-blue leather samples.

In accordance with Hauber,¹⁵ a normal stratigraphic distribution of fungicides in a hide is as follows: 60-70% in grain; 10-20% in the intermediate layer and 25-30% in flesh. Therefore, by analyzing the results obtained in our work (Fig. 3), all the fungicides considered followed these criteria except thiabendazole, which was uniformly distributed in the three layers. This could explain why this compound did not provide the adequate protection for this type of process. Presumably, a greater amount of fungicide in the external layer of a hide and, hence, an enhanced protection, prevents the penetration of spores.

Fungicide	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Trichoderma harzianum</i>		<i>QF01</i>		<i>QF02</i>		LL01	
	SG (%)	IZ (mm)	SG (%)	IZ (mm)	SG (%)	IZ (mm)	SG (%)	IZ (mm)	SG (%)	IZ (mm)
TCMTB	0	4	0.6	1.3	100	0	50	0	30	0
Mix of phenolics	0	5	13	0.7	100	0	38	0	6	0
DIMPTS	0	22	0	6	0	14	0	8	0	12
IPBC	0	35	0	26	0	28	0	33	0	29
TBZ	0	2	100	0	80	0	100	0	90	0
CONTROL	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0



Image 2. Growth of *QF01* mould on wet-blue samples after 90 days of testing. From left to right: Control, TCMTB, Mix of phenolics, DIMPTS, IPBC, TBZ.

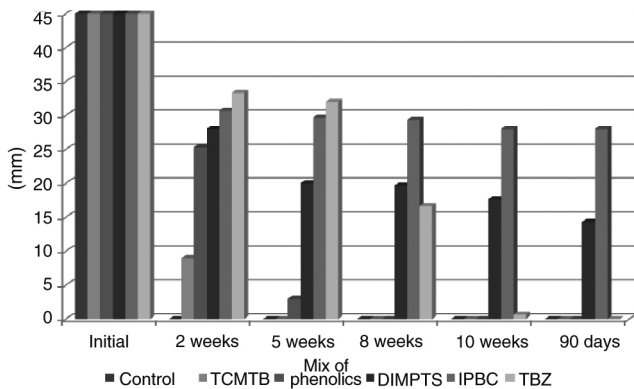


Figure 2. Evolution of Inhibition Zone against the growth of *QF01*.

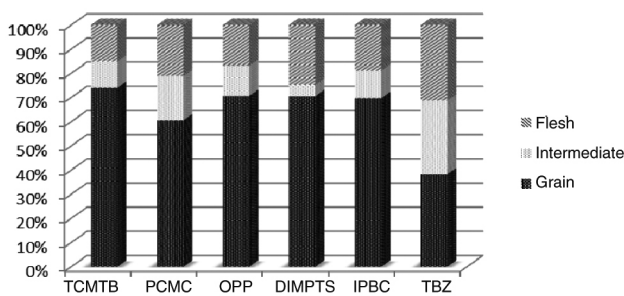


Figure 3. Stratigraphic distribution of fungicides in wet-blue leather.

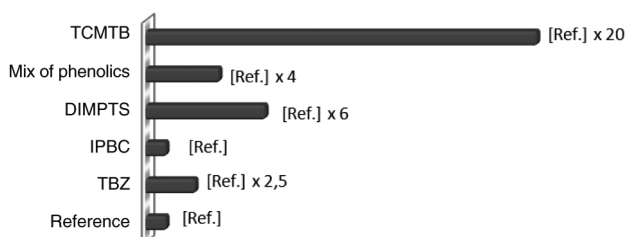


Figure 4. Toxicity of the wastewaters of the tanning processes and fungicides with respect to the reference.

4.2.1.3 Toxicity of wet-blue tanning process

Figure 4 shows the toxicity of the wastewaters of tanning processes to which different fungicides were added in accordance with the recipe of Table II. These values were compared with the toxicity of the wastewaters of a tanning process without fungicide, which was used as the reference.

TCMTB exhibited the highest toxicity whereas the three alternative compounds showed a much lower toxicity, which was similar to that of the mixture of phenolics. It should be pointed out that the toxicity of wastewaters of the tanning process and IPBC resembled that of the reference (without fungicide).

However, TCMTB is environmentally unstable. It is stable at the acid pH of the residual float but it is slowly degraded at pH7. The rate of the hydrolysis increases rapidly at higher pHs.¹⁶ This means that in the wastewater treatment plant conditions the toxicity due to TCMTB will be much less important than in the residual float.

4.2.2 Fatliquoring process of vegetable leather

The fatliquoring processes of vegetable leathers with the addition of three different fungicides carried out in accordance with the recipe of Table III gave rise to leathers with good organoleptic properties, colour levelness and absence of spots.

4.2.2.1 Control of fungal growth on fatliquored vegetable leathers

In this part of the work, only two compounds (DIMPTS and IPBC) were considered as alternative fungicides. Their antifungal capacity against the five aforementioned different strains was compared with that of TCMTB. Table VII shows the percentage of surface growth and the inhibition zone in millimetres. As observed, fatliquored samples treated with DIMPTS and IPBC were not covered by any fungi, *i.e.* 0% of surface growth in all cases after 20 days of testing.

Fungicide	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Trichoderma harzianum</i>		QF01		QF02		LL01	
	SG (%)	IZ (mm)	SG (%)	IZ (mm)	SG (%)	IZ (mm)	SG (%)	IZ (mm)	SG (%)	IZ (mm)
TCMTB	40	0	9	0	100	0	1	7	100	0
DIMPTS	0	7	0	7	0	2	0	10	0	3
IPBC	0	15	0	13	0	3	0	19	0	6
CONTROL	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0

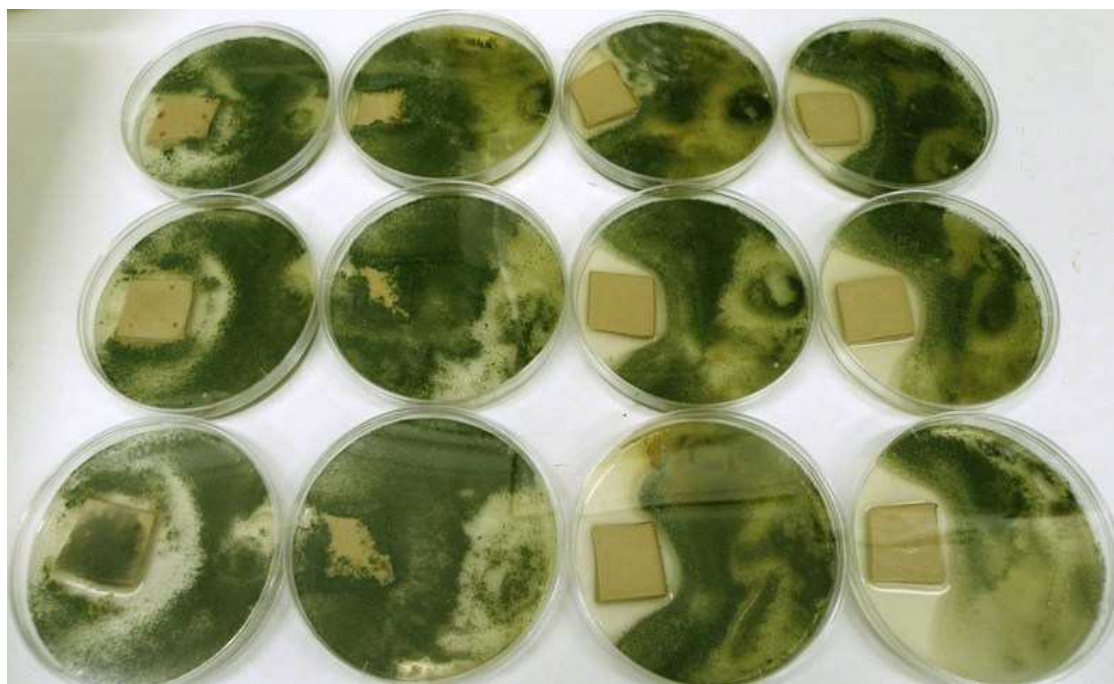


Image 3. Growth of *LL01* mould on fatliquored vegetable leather samples after 20 days of testing. From left to right: Control, TCMTB, DIMPTS, IPBC.

However, surface growth was 100% in the control samples (without fungicide) and in two samples treated with TCMTB for the fungi isolated from the tannery.

Image 3 clearly shows the difference between the alternative fungicides and TCMTB. After 20 days of testing, vegetable leather samples treated with DIMPTS and IPBC were totally free of *LL01* mould whereas samples treated with TCMTB were completely overgrown by mould after two weeks of treatment.

The inhibition zone against the different fungi on the agar plate decreased as the testing time increased. For all the samples, after 20 days of testing there continued to be an inhibition zone around the samples treated with IPBC and DIMPTS whereas an inhibition zone did

not exist around samples without fungicide (control) or those treated with TCMTB after seven days of testing.

It is more difficult to protect vegetable leathers against fungal growth than chrome leather because vegetable extracts (polyphenols combined with carbohydrates) provide fungi with a direct nutrient in the form of simple sugars.

4.2.3 Preservative pickling process

4.2.3.1 Control of fungal growth on pickled bellies

Table VIII shows the inhibition zone in millimetres and the percentage of surface growth in pickled samples. As observed, the alternative fungicides

Fungicide	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Trichoderma harzianum</i>		QF01		QF02		LL01	
	SG (%)	IZ (mm)	SG (%)	IZ (mm)	SG (%)	IZ (mm)	SG (%)	IZ (mm)	SG (%)	IZ (mm)
TCMTB	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
DIMPTS	6	0	33	0.7	35	0	57	0	1.7	4
IPBC	5	0.7	95	0	90	0	90	0	0	7
CONTROL	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0

DIMPTS and IPBC also provided a greater antifungal protection than TCMTB when applied in a preservative pickling process. Although the amount of added fungicide was not sufficient to avoid sample contamination after 90 days of incubation, this amount was adequate, in the case of the alternative fungicides, to prevent the surface of the treated samples from being completely overgrown by fungi.

Figure 5 shows the evolution of the inhibition zone against the growth of *Trichoderma harzianum* on the agar plate. Alternative fungicides behave much better than TCMTB. Probably, with a greater offer of DIMPTS and IPBC, the antifungal protection after 90 days would have been adequate.

The samples treated without fungicide or with TCMTB were completely covered by mould whereas those treated with DIMPTS and IPBC showed greater antifungal protection after 10 weeks of testing.

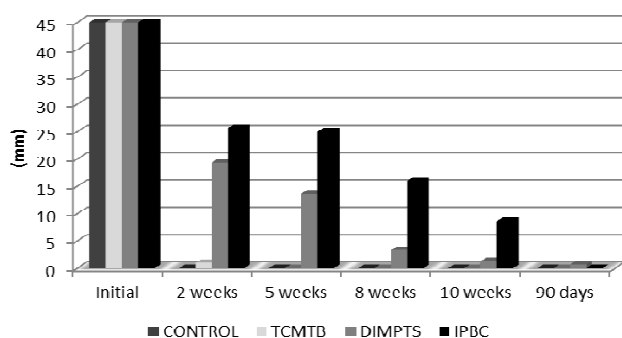


Figure 5. Evolution of inhibition zone against the growth of *Trichoderma harzianum*.

5. CONCLUSIONS

The strains isolated from the tannery revealed a greater resistance to all fungicides. These strains resisted the action of conventional fungicides possibly applied to the tanning process, *i.e.* these strains possess an 'acquired' resistance to these compounds.

The greater antifungal capacity of two of the alternative fungicides, DIMPTS (diiodomethyl-p-tolylsulfone) and IPBC (3-iodoprop-2-ynyl-N-butylcarbamate) applied to different processes: wet-blue tanning process, fatliquoring of vegetable leather and preservative pickling process confirms that they could be used in the leather sector. The other alternative, TBZ (thiabendazole), does not possess sufficient antifungal capacity to prevent contamination of wet-blue samples.

All the fungicides considered in this work, except TBZ, were distributed throughout the thickness of wet-blue hides in accordance with the values reported in the literature. Presumably, an enhanced protection in the external layers of a hide prevents the penetration of spores.

This work confirmed the high level of toxicity of wastewaters of the wet-blue tanning process when using TCMTB. However, as noted earlier, TCMTB is environmentally unstable, it is slowly degraded at pH7 and the rate of the hydrolysis increases rapidly at higher pHs.¹⁶ This means that in the waste water treatment plant conditions the toxicity due to TCMTB

will be much less important than in the residual float. The lowest toxicity of wastewaters corresponded to the treatment with IPBC, which, in turn, provided the highest antifungal protection.

Vegetable leathers treated with the alternative fungicides (DIMPTS and IPBC) in the fatliquoring process showed good organoleptic properties and an absence of spots. A minimum amount of these compounds was sufficient to prevent fungal growth in fatliquored vegetable leathers for a reasonable period of time.

Likewise, in a preservative pickling process, DIMPTS and IPBC gave better results than TCMTB. Although the amount of added fungicide was not sufficient to prevent sample contamination after 90 days of incubation, this amount was adequate, in the case of the alternative fungicides, to prevent the growth of fungi in 100% of the treated sample surface.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation through the CTQ2009-08347 Project. The authors are indebted to Mr. George von Knorring for reviewing the English version of the manuscript.

(Received May 2012,
additional data August 2012)



References

- Orlita, A., Microbial biodeterioration of leather and its control: a review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2004, **53**, 157-163.
- Russel, Pinchuck and Cooper, Fungicide Evaluation for the protection of wet-blue hides. *J. Soc. Leather Technol. Chem.*, **69**, 135-140.
- Amanda Bugby, The practical evaluation of fungicides. *J. Soc. Leather Technol. Chem.*, **71**, 138-141.
- Binnur Meriçi Yapici and Ismail Karaboz, The effect of two anti-fungal compounds on the growth of molds that frequently appear on tanned leather. *J. Amer. Leather Chem. Ass.*, 1997, **92**, 38-45.
- Padoan, K., New generation of fungicides for leather preservation. Proceedings of II Eurocongress of the International Union of Leather Technologists and Chemists Societies (IULTCS), May 2006, Istanbul.
- Galloway, Fungicides for treating wet-blue hides. *J. Soc. Leather Technol. Chem.*, **58**, 67.
- Cuadros S., Manresa M., Font J. *et al.*, Alternative Fungicides: comparative study with conventional chemicals. *J. Soc. Leather Technol. Chem.*, 2011, **95**(6), 263-269.
- Seguer, J. and Beltrán, M^a T., Productos biocidas notificados en la Directiva 98/8/CE en el sector de curtición. Proceedings 52 Congreso AQEIC, Lorca, abril 2003, p. 37-47.
- Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de febrero de 1998, Official Journal of the European Communities de 24 de abril de 1998, p. L123/1 – L123/63.
- Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) = 2000 Copyright by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI, 6, p. 509-515.

11. Andrews, Jennifer M., Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, **48**, Suppl. S1, p. 5-16.
12. ASTM D 4576-01; Standard Test Method for Mold Growth Resistance of Wet-Blue.
13. ISO/DIS 13365; Leather – Chemical Tests – Determination of the preservative (TCMTB, CMK, OPP, OIT) content in leather.
14. UNE EN ISO 11348-3:2009, Calidad del agua. Determinación del efecto inhibidor de muestras de agua sobre la luminiscencia de *Vidrio fischeri* (ensayo de bacterias luminiscentes). Parte 3; Método utilizando bacterias liofilizadas.
15. Hauber, C., Microbicide applications in the leather industry. In: Paulus, W. (Ed), *Directory of Microbicides for the Protection of Materials*, Springer, Berlin, p. 317-324.
16. H. W. Hanssen, N. D. Henderson and J. E. H. Ward, A review of the environmental impact and toxic effects of TCMTB. Environmental Protection Division, B.C. Environment, 810 Blanshard Street, Victoria, British Columbia, V8V 1X5.

Alternative Fungicides for leather industry. Part I

Sara Cuadros¹, M^a Àngels Manresa³, Joaquim Font², M^a Elena Bautista¹, Fernando Maldonado¹, Agustí Marsal¹

¹ Department of Chemical Technology and surfactants, IQAC, CSIC, Barcelona – agusti.marsal@iqac.csic.es

² Igualada Leather Technology School, EEI, UPC, Igualada (Barcelona)

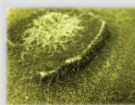
³ Faculty of Pharmacy, Department of Microbiology UB, Barcelona



INTRODUCTION

Optimum conditions for the growth of several fungi:

- a pH range between (3-6)
- a temperature of 25°C
- humidity between 12-15%



These conditions and the presence of proteins and fats make wet-blue leather provides suitable conditions for the growth of fungi.

AIM OF THE WORK

This work is focused on the search of alternatives to the fungicides conventionally used in the tanning industry. These alternatives should have a high efficiency in front of a wide range of fungi and should be less toxic, more environmentally friendly and cost effective.

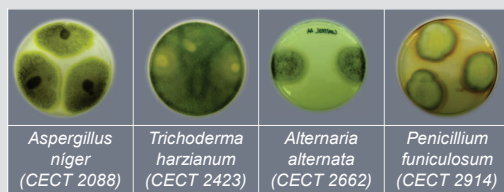
The main objective is to evaluate the fungicidal capacity of the selected compounds (registered in the 98/8/EC Directive) against different strains of fungi. The fungicidal capacity of the selected compounds will be compared with that of fungicides conventionally used in tannery such as TCMTB and a mixture of phenolics compounds.

CONTENTS

MATERIAL

SELECTED FUNGICIDE	CHEMICAL STRUCTURE
2-(tiocianatometilto)-1,3-benzotiazol TCMTB (~ 30% active ingredient)	
Mixture of phenolic compounds (PCMC+OPP) (~ 40%) (clorometacresol + ortofenilfenol)	
Diiodometil-p-tolilsulfona DIMPTS (~ 40% active ingredient)	
3-iodoprop-2-in-N-butilcarbamat IPBC (~ 30% active ingredient)	
Thiabendazole TBZ (~ 60% active ingredient)	

The fungicidal capacity of the selected fungicides was carried out against strains of the following fungi →



METHODS

Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Control of fungal growth on wet-blue skin

Offers of 0.1% - 0.5% - 1% of fungicide

Comparative study with 0.2% of fungicide

Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

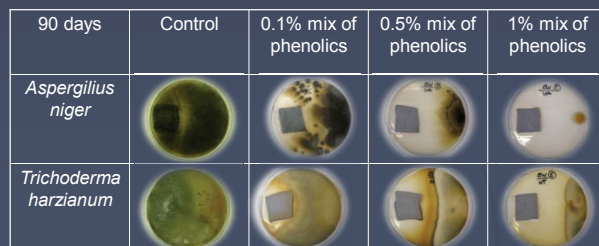
Minimum inhibitory concentration (MIC) is defined as the lowest concentration (expressed in µg/mL) of an antimicrobial that will inhibit the visible growth of a microorganism after an incubation period.

Fungicide µg/mL	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Alternaria alternata</i>
TCMTB	7.6	15.3	7.6	0.95
Mix of Phenolics	62	31	124	62
DIMPTS	3.8	1.9	7.6	1.1
IPBC	0.8	1.9	3.9	0.8
TBZ	3.9	0.95	1.9	---

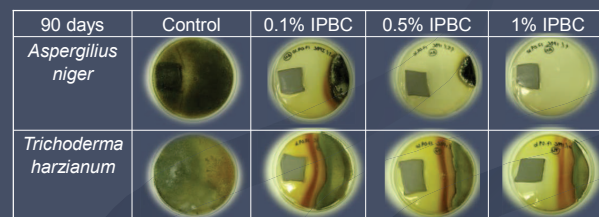
Control of fungal growth on wet-blue skin

Offers of 0.1% - 0.5% - 1% of fungicide

Results of the fungicidal capacity of different offers of the phenolic compound mixture after 90 days of testing

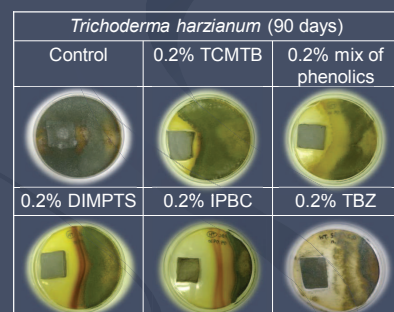


Results of the fungicidal capacity of different offers of IPBC after 90 days of testing



Comparative study with 0.2% of fungicide

Results of the fungicidal capacity of 0.2% of the five selected chemicals against *Trichoderma harzianum* after 90 days of testing



CONCLUSIONS

From the fungicides conventionally used in tannery and studied in this work, the TCMTB shows the highest antifungal capacity against the tested fungi (*Aspergillus niger* and *Trichoderma harzianum*), mainly against *Aspergillus niger*. The mixture of phenolics compounds is not adequate against *Trichoderma harzianum* at normal application offers and *Aspergillus niger* is also resistant to the action of the mixture when this is applied at low offers.

Low offers of two of the three alternative fungicides studied (DIMPTS and IPBC) confer satisfactory mould growth resistance to the treated wet-blue leather samples as shown by the values of sample surface growth and inhibition zone obtained. As far as TBZ is concerned, the commercial formulation tested resulted inefficient against the selected fungi, at least at the lowest offers applied in the tests.

The results obtained confirm that DIMPTS and IPBC are good candidates as alternative fungicides to be used in the leather industry. However, their potential application should be checked against a wider spectrum of fungi especially those isolated in tannery. This constitutes the aim of the next study together with toxicity evaluation associated to such application.

REFERENCES

- Orlita, A., Microbial biodeterioration of leather and its control: a review, International Biodeterioration and Biodegradation, 53, 157-163 (2004)
- Seguer, J., et al.; Disminución de la toxicidad de las aguas residuales de un proceso de curtición en el que se ha utilizado TCMTB como protector de las pieles, Proceedings 51 Congreso AQEIC, Tortosa, abril 2002, pp.101-109
- Hauber, C., Microbicide applications in the leather industry, En: Paulus, W. (Ed), Directory of microbicides for the protection of materials, Springer, Berlin, pp 317-324



ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation through the CTQ2009-08347 Project. The authors are indebted to Mr. George von Knorring for reviewing the English version of the manuscript.

**FUNGICIDAS ALTERNATIVOS PARA LA
INDUSTRIA DE CURTIDOS.
APLICACIÓN EN DIFERENTES PROCESOS**

**Sara Cuadros¹, M^a Àngels Manresa³, Joaquim Font², M^a Elena Bautista¹, Rita Puig²,
Agustí Marsal¹**

¹ Departamento de Tecnología Química y Tensioactivos, IQAC, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Barcelona, Spain; Teléfono 93 400 61 55; ammeco@iiqab.csic.es

² Escola d'Enginyeria d'Igualada, EEI, Universitat Politècnica de Catalunya, (UPC), Igualada, Spain, teléfono 93 803 53 00; joaquim.font@eei.upc.edu

³ Facultat de Farmàcia, Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain.

**FUNGICIDAS ALTERNATIVOS PARA LA INDUSTRIA DE CURTIDOS.
APLICACIÓN EN DIFERENTES PROCESOS**

RESUMEN

Una legislación medioambiental cada vez más estricta y un uso imprescindible de fungicidas en la industria de curtidos obligan a este sector a adaptar sus procesos a tecnologías alternativas de menor impacto ambiental, incluyendo la búsqueda de nuevos sistemas fungicidas que cumplan con dicha normativa.

Se comparó la capacidad fungicida de productos alternativos (diiodometil-p-tolilsulfona DIMPTS, 3-iodo-2-propinil butilcarbamato IPBC y Tiabendazol TBZ) con la de compuestos convencionalmente usados (2-(tiocianometiltio)benzotiazol TCMTB y mezcla de compuestos fenólicos). Esta capacidad fungicida se evaluó, frente a diferentes cepas de hongos y en distintos procesos. Se aplicaron los fungicidas a la curtición al cromo de piel vacuna, a un engrase de piel vegetal y a un píquel de conservación. Los estudios posteriores consistieron en un control microbiológico de inoculación de las muestras, con hongos comunes en curtidos, determinación del contenido de fungicida en la piel, y un estudio de toxicidad de las aguas residuales del proceso.

Un mejor comportamiento del DIMPTS y del IPBC en los diferentes procesos, junto con los resultados obtenidos en un trabajo anterior (7) aseguran fiabilidad para utilizarlos en una amplia variedad de operaciones.

Las pieles obtenidas utilizando los fungicidas alternativos no mostraron manchas ni otros defectos, y respecto al impacto medioambiental, la toxicidad de los baños residuales fue menor en el caso de los productos propuestos como alternativos frente a los usados comúnmente.

Palabras clave → *fungicidas alternativos, cepas de hongos, wet blue, piel vegetal, píquel de conservación, toxicidad*

**ALTERNATIVE FUNGICIDES FOR THE LEATHER INDUSTRY.
APPLICATION IN DIFERENT PROCESSES**

ABSTRACT

Increasingly stringent environmental legislation and indispensable use of fungicides in the tanning industry obliges tanners to adapt their processes to alternative technologies with lower environmental impact, including the search for new fungicides systems that comply with those rules.

The fungicidal capacity of alternative compounds, diiodometil p-tolylsulfone DIMPTS, 3-Iodo-2-propynyl butylcarbamate IPBC and thiabendazole TBZ) was compared to that of conventional fungicides, (2-(thiocianometilthio)-1,3-benzothiazole TCMTB and the mixture of phenolic compounds. This fungicidal capacity was evaluated against different strains of fungi in different processes. Fungicides were applied in the chrome tanning process, a fatliquoring process of hides tanned with vegetable extracts and a preservative pickling process. Further studies consisted of a microbiological control samples inoculated with fungi common in tanning, determination of the fungicide content on the skin, and a toxicity study of process wastewater.

The results obtained in an earlier work (7) and the higher antifungal capacity of DIMPTS and IPBC obtained in the different processes, ensure the possibility of use them in the leather sector.

The skins obtained using alternative fungicides showed no stains or other defects, and in relation with the environmental impact, toxicity from wastewater was lower in the case of the alternative products against those commonly used.

Keywords → *alternative fungicides, strains of fungi, wet blue, vegetable leather, preservative pickling process, toxicity*

1. INTRODUCCIÓN

En las tenerías es necesaria la adición de productos fungicidas para evitar el ataque de hongos que puede producirse después de diferentes etapas del proceso de transformación; piqué, curtición, tintura y engrase. La piel atacada por hongos se evidencia por la presencia de manchas permanentes y deterioro de las propiedades físicas, debido a la degradación del colágeno. (1)

La legislación medioambiental cada vez es más estricta, lo que obliga a la industria de curtidos a adaptar sus procesos a tecnologías alternativas de menor impacto ambiental, ello incluye la búsqueda de nuevos sistemas fungicidas que cumplan con dicha normativa.

Estudios anteriores (2) demuestran que existen productos que actúan como fungicidas, que se usan en sectores no relacionados con el cuero pero que se pueden introducir en esta industria y obtener resultados satisfactorios de protección a la vez que un menor impacto medioambiental.

En un trabajo previo (7) se compararon fungicidas de uso común en curtidos con otros compuestos propuestos como alternativos, y se concluyó que dos de ellos (diiodometil-p-tolilsulfona, DIMPTS y el 3-iodo-2-propinil butilcarbamato, IPBC) ofrecen una satisfactoria resistencia a las muestras de piel wet blue tratadas con estos productos, y por tanto se proponen como una buena alternativa para trabajar en la industria de curtidos. Estos compuestos se seleccionaron de acuerdo con los productos notificados y registrados en la Directiva 98/8/CE. Para poder confirmar los resultados obtenidos, se deberán abordar más estudios con un mayor abanico de cepas y en distintas condiciones.

2. OBJETIVOS

El trabajo se centra en la búsqueda de productos fungicidas de mayor eficacia frente un amplio espectro de hongos, de menor toxicidad y de menor impacto medioambiental, como nuevas opciones a los productos convencionalmente usados en la industria de curtidos.

El objetivo principal es evaluar la capacidad fungicida de los compuestos seleccionados (compuestos notificados y registrados en la Directiva 98/8/CE (8)) frente a diferentes cepas de hongos y en diferentes situaciones. La capacidad fungicida de estos compuestos se comparará con la del TCMTB, fungicida usado habitualmente en tenería y con la de la mezcla de compuestos fenólicos.

En esta parte del trabajo se aplicarán los fungicidas a la curtición al cromo de piel vacuna, en bombos de laboratorio. Los análisis posteriores consistirán en realizar un control microbiológico de inoculación de la piel, con cepas comunes en curtidos. Se determinará la distribución estratigráfica del fungicida en la piel, y se realizará un estudio de toxicidad de las aguas residuales del proceso.

Para complementar los estudios, se observará el efecto del fungicida añadido en dos tipos de procesos distintos, también para piel vacuna: i) un engrase en piel curtida con extractos vegetales en el que se añadirán los distintos fungicidas escogidos, donde se estudiará el crecimiento de cepas en la piel y se determinará el contenido de fungicida en ella para cada caso, y ii) un píquel de conservación, en el que se realizará el estudio de crecimiento de hongos.

Para los análisis de crecimiento se utilizarán cepas de hongos adquiridas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia y cepas aisladas de fábricas de curtidos.

Todo ello ayudará a evaluar las opciones que se proponen como fungicidas alternativos para este sector.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Material

Se evaluó la eficacia de cinco compuestos distintos; dos de ellos de uso común en el sector y tres fungicidas de nueva aplicación en curtidos. La relación de fungicidas se muestra en la Tabla 1 (todos ellos, productos notificados y registrados en la Directiva 98/8/CE) (8)

	Fungicida	Nombre químico
Fungicidas de uso común en el sector	TCMTB	2-(tiocianometiltio)benzotiazol
	Mezcla compuestos fenólicos	p-cloro-m-cresol + ortofenilfenol
Fungicidas propuestos como alternativos	DIMPTS	diiodometil-p-tolilsulfona
	IPBC	3-iodo-2-propinil butilcarbamato
	TBZ	Tiabendazol

Tabla 1. Detalles de los fungicidas utilizados para este estudio

La eficacia de estos productos se evaluó frente al crecimiento de cinco cepas de hongos comunes en tenería. Dos de ellas obtenidas de la CECT; *Aspergillius niger* y *Trichoderma harzianum*, que se recibieron liofilizadas y se hicieron crecer en un nutriente agar adecuado hasta la obtención de esporas viables. Las tres cepas restantes fueron rescatadas de contaminaciones en fábricas de curtidos, a las que nombramos como *QF01*, *QF02* y *LL01*, y que se aislaron utilizando nutriente adecuado, para su posterior identificación (Ver 3.2)

Con solución salina al 85%, se obtuvo una suspensión de esporas de cada cepa, y se realizó un recuento (con microscopio y sobre placa) para controlar la cantidad de esporas/mL en el momento de hacer las siembras.

Los medios de cultivo para desarrollar el crecimiento de hongos en placa, fueron los siguientes; agar dextrosa saboraud y agar dextrosa patata.

3.2. Aislamiento e identificación de cepas procedentes de pieles contaminadas

A partir de contaminaciones reales de fábricas de curtidos se pudieron extraer e identificar los hongos responsables de dicha contaminación. (Imagen 1)



Imagen 1. Aspecto de las tres cepas de hongos aisladas; de izquierda a derecha; LL01, QF01, QF02

Para aislarlos de la piel, se sumergió cada pieza contaminada en solución ringer y se dejó en agitación durante 24h. Pasado este tiempo, se sembraron unas gotas de las soluciones obtenidas en el medio de cultivo de agar dextrosa patata y se observó el crecimiento. El siguiente paso fue separar perfectamente los tipos de cepas que se apreciaron para asegurarnos de tener cepas de hongos completamente aisladas. Las muestras obtenidas se enviaron a la CECT, donde identificaron el nombre de los hongos encontrados:

- QF01 – *Penicillium spinulosum*
- QF02 – *Penicillium decumbens*
- LL01 – *Trichoderma harzianum*

Además de utilizar la cepa de *Trichoderma harzianum* obtenida de la CECT, también se utilizó la cepa aislada LL01, ya que, aunque se trate de la misma especie, es posible que tengan un comportamiento distinto frente a los fungicidas debido a la resistencia adquirida por el hongo recogido de fábrica.

3.3. Determinación de la Concentración Mínima de Inhibición (CMI)

La cantidad mínima de fungicida necesaria para inhibir el crecimiento visible de un microorganismo, expresada en $\mu\text{g/mL}$, proporciona la CMI. Cada producto fungicida presenta una CMI distinta frente a cada tipo de hongo (10).

Para determinar la CMI se siguió la norma ASTM D 4576-01 (Standard Test Method for Mould Growth Resistance of Wet Blue); según este método se prepara un rango de diluciones entre $10240\mu\text{g/mL}$ hasta $0.078\mu\text{g/mL}$ de cada fungicida, y se evalúa qué dilución inhibe el crecimiento de hongos sembrados. (11)

En este estudio se determinó la CMI de cada uno de los fungicidas para los hongos aislados de las fábricas de curtidos. Para las cepas adquiridas de la CECT, ya se determinó la CMI en un trabajo anterior, (7) incluyéndose los resultados en este trabajo.

3.4. Aplicación de fungicida en tres tipos de procesos distintos; curtición piel wet blue, engrase de piel vegetal, píquel de conservación

En todos los casos, se partió de faldas de piel vacuna de 32kg+, procedentes de Francia y la aplicación se realizó en bombos de laboratorio.

Antes de empezar las pruebas, se efectuó una extracción de cada piel con acetonitrilo, para determinar posibles restos de fungicidas de procesos anteriores con el cromatógrafo de líquidos. De esta manera, nos aseguramos que no contenían ningún tipo de los fungicidas utilizados en el proyecto.

3.4.1 Curtición de piel wet blue

Se partió de una falda en estado de píquel. Se dividió la piel en cinco partes iguales, para trabajar con los cinco fungicidas escogidos (Tabla 1) y se curtió cada fracción en un bombo distinto (Tabla 2).

Porcentaje sobre peso de piel tripa	
60% H ₂ O	
4% cloruro de sodio	
4% sal de cromo 33% basicidad	Rodar 60'
0,1% fungicida disuelto 1:4 (H ₂ O caliente)	Rodar 60'
4% sal de cromo 33% basicidad	Rodar 3h
1% formiato de sodio	Rodar 3h
Noche en reposo	
Controlar el pH (entre 2,8 – 3)	
1-1.5% bicarbonato de sodio	Rodar 90'
Controlar el pH (entre 3,5 – 4)	
0,1% fungicida disuelto 1:4 (H ₂ O caliente)	Rodar 60'
Ecurrir - vaciar	

100% H ₂ O Ecurrir - vaciar	Rodar 15'
---	-----------

Tabla 2. Curtición piel wet blue

Los baños obtenidos se guardaron congelados para conservar sus propiedades hasta el momento de realizar la determinación de la toxicidad.

De cada ejemplar curtido se guardó:

- Una muestra húmeda para observar el crecimiento de hongos en la piel. Conservada a 4°C.
- Una muestra seca para poder determinar estratigráficamente el contenido de fungicida en cada capa: capa flor, capa intermedia y capa carne. Conservada a temperatura ambiente.

3.4.1.1. Control de crecimiento de hongos en wet blue

Se realizó un control de crecimiento de hongos en cada piel curtida con un fungicida distinto para cada una de las cinco cepas escogidas. Se efectuó el estudio por triplicado, sobre placas estériles con medio de cultivo agar de patata, tal y como indica la norma ASTM D4576-01 (12). El crecimiento se controlaba frente a un blanco-control, una piel de las mismas características que el resto, pero sin producto fungicida añadido.

Se estudió el comportamiento del *Aspergillus niger*, el *Trichoderma harzianum*, y de las cepas aisladas; LL01, QF01, QF02. Se colocaron las muestras en placas, rodeadas de medio de cultivo que se dejó solidificar, y se añadieron 2 gotas de solución de esporas (del orden de 10⁵ esporas/mL de concentración) de cada hongo escogido; una encima de la piel y otra encima del cultivo (Figura 1).

Se almacenaron las placas a 26°C, en atmósfera húmeda y semanalmente se hizo la lectura de resultados frente al blanco-control hasta un máximo de 90 días. La mejor forma de evaluar los resultados obtenidos en este estudio fue observar el crecimiento de moho en las muestras wet blue tratadas, depositadas en las placas de cultivo. De acuerdo con la norma ASTM D 4576-01 (12), el informe de los resultados del crecimiento de moho debe incluir el porcentaje de superficie cubierta por hongos. Para precisar los resultados, en las muestras en las que el porcentaje de crecimiento sobre la piel fue del 0%, se introdujo otro parámetro llamado “Zona

de inhibición” (Figura 1), que se define como la distancia (mm), alrededor de la muestra, dónde el fungicida, debido a su efecto radiante, inhibe el crecimiento de moho.

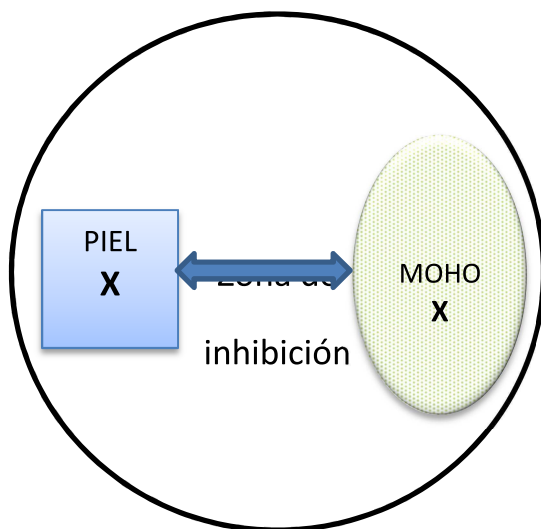


Figura 1. Ejemplo con las localizaciones de la inoculación (X).
Zona de inhibición provocada por el fungicida contenido en la piel.

3.4.1.2. Determinación del fungicida en las distintas capas de la piel wet blue

La piel wet blue que se dejó secar, se dividió en tres capas; flor, intermedio y carne, y se determinó el contenido de fungicida en cada una de ellas.

Cada capa se trituró para obtener polvo de piel, y hacer la determinación de fungicida por cromatografía líquida. El análisis se realizó siguiendo la norma ISO/DIS 13365 (13), para la determinación de fungicidas en piel, y adaptándola a los fungicidas aquí ensayados. Consta de una primera parte de extracción del producto con ultrasonidos con el disolvente adecuado y su posterior determinación en el cromatógrafo HPLC. El disolvente utilizado fue acetonitrilo en todos los casos, excepto para el tiabendazol, para el que se usó metanol debido a la baja solubilidad de éste en acetonitrilo,

3.4.1.3. Determinación de la toxicidad de los baños residuales de curtición

Para cada uno de los baños residuales de la curtición, se determinó la toxicidad según la norma de calidad del agua UNE EN ISO 11348-3:2009. (14) De esta manera se pudo

comparar el impacto medioambiental que suponían los fungicidas alternativos respecto a los usados comúnmente.

3.4.2. Engrase de piel vegetal

Se partió de una falda curtida con extractos vegetales que se fragmentó en tres partes iguales. Para esta prueba se utilizaron dos de los fungicidas propuestos como alternativos (DIMPTS e IPBC) y como referencia se escogió el TCMTB. El TBZ se descartó debido a los desfavorables resultados obtenidos hasta el momento, y como referencia se decidió utilizar solamente el más común.

Se realizó el engrase de las tres piezas al mismo tiempo y en bombos distintos. (Tabla 3).

Porcentaje sobre peso de piel curtida	
0,40% Ácido oxálico	Rodar 20'
0,40% EDTA disódico	
150% H ₂ O	
100% H ₂ O	
Escurrir – vaciar	
70% H ₂ O	
4,30% Engrase (<i>Triglicéridos naturales y aditivos sintéticos sulfatados</i>)	
1,00% Engrase sulfitado	
0,05% Fungicida	
0,25% EDTA disódico	
0,17% Ácido oxálico	Rodar 60'
Escurrir – vaciar	Rodar 25'
160% H ₂ O	Rodar 1'
Escurrir – vaciar	

Tabla 3. Engrase de piel vegetal

El fungicida se mezcló junto con los engrases empleados, y ésta mezcla se emulsionó perfectamente con agua a 55°C.

De la piel obtenida se determinó el contenido de fungicida en ella (una vez seca) y se realizó el estudio de crecimiento de hongos (en húmedo).

3.4.2.1. Control de crecimiento de hongos en piel vegetal

El estudio de crecimiento de moho se realizó para todas las muestras de igual manera que para muestras de piel curtidas al cromo (*ver 3.4.1.1*), con la diferencia de que para muestras al vegetal sólo se mantuvo el control durante 20 días, debido a que, en casos reales, no permanecen más de 15 días almacenadas en estas condiciones.

3.4.2.2. Determinación de fungicida en la piel vegetal

Las tres partes se trituraron para obtener polvo de piel, y hacer la determinación de fungicida por cromatografía líquida. El análisis se realizó siguiendo la norma ISO/DIS 13365 (13), para la determinación de fungicidas en piel (*ver 3.4.1.2*)

3.4.3. Píquel de conservación

Se partió de una falda desengrasada que se dividió en tres partes iguales para añadir tres fungicidas distintos (TCMTB, DIMPTS e IPBC), guardando previamente una muestra para el control.

La Tabla 4 muestra el proceso de píquel de conservación que se efectuó para cada muestra.

Porcentaje sobre peso de piel tripa	
4,0% NaCl	Rodar 20'
1,0% H ₂ SO ₄	Rodar 90'
Ecurrir – vaciar	
1,0% NaCl	
0,25% H ₂ SO ₄	
0,11% Fungicida	Rodar 3h

Tabla 4. Fórmula de píquel de conservación

3.4.3.1. Control de crecimiento de hongos en piel piquelada

De la piel obtenida con cada fungicida, se reservó muestra para realizar el control de crecimiento de hongos. Este estudio se llevó a cabo como en los apartados anteriores (*ver 3.4.1.1*), y las piezas estuvieron en observación durante 90 días.

4. RESULTADOS

4.1 Determinación de la Concentración Mínima de Inhibición (CMI)

Los resultados de la CMI de los productos fungicidas ensayados para cada una de las cinco cepas seleccionadas se muestran en la Tabla 5.

Fungicida	Cepas adquiridas		Cepas aisladas		
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	QF01	QF02	LL01
TCMTB	7.6	7.6	61	17	17
Mezcla compuestos fenólicos	62	124	122	122	122
DIMPTS	3.8	7.6	7.6	15.2	15.2
IPBC	0.8	3.9	3.8	3.8	3.8
TBZ	3.9	1.9	242	120	1.9

Tabla 5. Concentración Mínima de Inhibición (CMI) en µg/mL

Los fungicidas propuestos como alternativos demuestran una eficacia mayor que los productos usados normalmente en el sector, tanto para las cepas adquiridas de la CECT como para las cepas aisladas de fábricas de curtidos. Estas cepas recogidas e identificadas revelan mayor resistencia a cualquier ataque fungicida ya que son resultantes de sobrevivir a un proceso de curtición, seguramente tratado con los fungicidas comunes, por tanto, con una resistencia adquirida a estos productos.

4.2. Aplicación de fungicida en tres tipos de procesos distintos; curtición piel wet blue, engrase de piel vegetal, píquel de conservación

4.2.1 Curtición wet blue

4.2.1.1 Control de crecimiento de hongos en wet blue

Los resultados obtenidos muestran que con DIMPTS e IPBC (dos de los tres fungicidas alternativos propuestos) no existe crecimiento sobre la piel con ninguna cepa, y el halo de inhibición que desprenden es mayor que el resto. El TBZ, así como los fungicidas convencionales, no tiene suficiente capacidad antifúngica para evitar la contaminación de las muestras. (Tabla 6)

FUNGICIDA	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Trichoderma harzianum</i>		QF01		QF02		LL01	
	CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)
TCMTB	0	4	0.6	1.3	100	0	50	0	30	0
Mezcla compuestos fenólicos	0	5	13	0.7	100	0	38	0	6	0
DIMPTS	0	22	0	6	0	14	0	8	0	12
IPBC	0	35	0	26	0	28	0	33	0	29
TBZ	0	2	100	0	80	0	100	0	90	0
CONTROL	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0

Tabla 6. Resultados de Crecimiento en Superficie (CS) y Zona de Inhibición (ZI) para las muestras de wet blue, transcurridos 90 días de control.

La gráfica de la evolución del halo de inhibición a lo largo de los 3 meses frente al *Aspergillus niger* (Gráfico 1) ayuda entender los resultados.

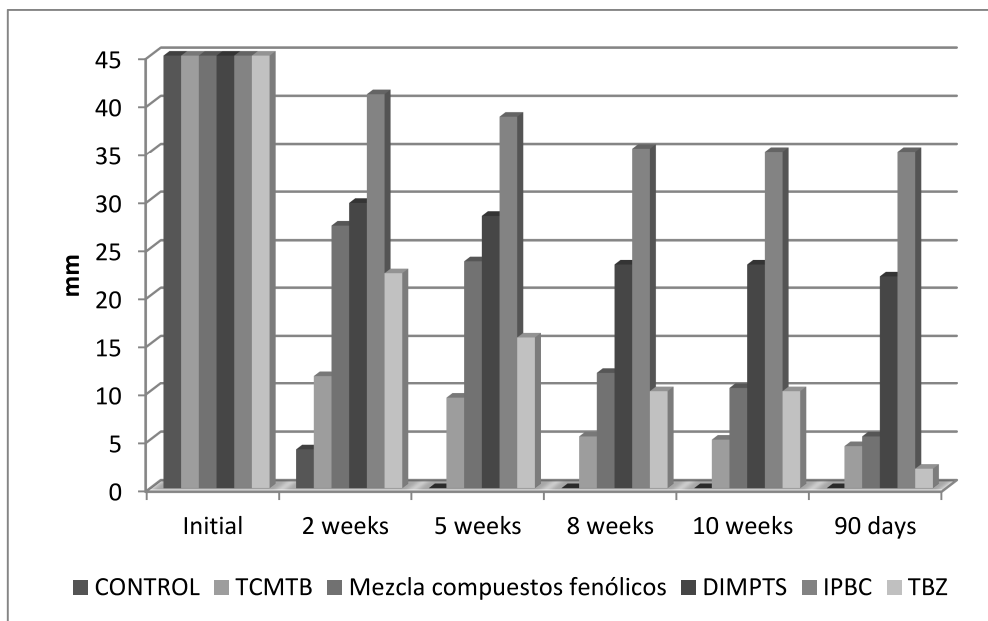


Gráfico 1. Evolución de la Zona de Inhibición para el *Aspergillus niger* durante 90 días

La imagen 2, es un claro ejemplo del control de crecimiento en las muestras donde se sembró la cepa *QF01*. Cada columna corresponde a un fungicida distinto, ya que las pruebas se realizaron por triplicado. Se observa perfectamente como los fragmentos con DIMPTS e IPBC (cuarta y quinta columna) evitan el crecimiento de hongos en la piel wet blue y evitan que éstos crezcan alrededor, creando un efectivo halo de inhibición.



Imagen 2. Control de crecimiento de hongos *QF01* sobre piel wet blue después de 90 días de incubación. Columna de izquierda a derecha: Control, TCMTB, Mezcla compuestos fenólicos, DIMPTS, IPBC, TBZ.

4.2.1.2 Determinación del fungicida en las distintas capas de la piel wet blue

Según Hauber (15), la distribución del fungicida en las capas de una piel bovina es distinta, y se puede generalizar resumiendo que la capa flor contiene un 60-70%, la capa intermedia un 10-20% y la capa carne puede absorber un 25-30% de fungicida. Siguiendo estas pautas, y con los resultados obtenidos (Tabla 7, Gráfico 2) se observa que prácticamente todos los productos analizados cumplen con estos criterios, excepto el tiabendazol, que se distribuye uniformemente en las tres capas, quizás sea éste uno de los motivos por los que la protección que ofrece este producto no es la adecuada para este tipo de procesos. Es posible que una protección mayor en el exterior de la piel evite en mayor grado la entrada de las esporas.

	TCMTB	Mezcla compuestos fenólicos		DIMPTS	IPBC	TBZ
		CMC	OPP			
Flor	74.0	60.6	70.6	70.5	69.7	38.3
Intermedia	10.9	18.2	12.5	4.8	11.4	30.4
Carne	15.1	21.1	16.9	24.7	18.9	31.3

Tabla 7. Porcentaje de fungicida (%) contenido en cada capa de piel.

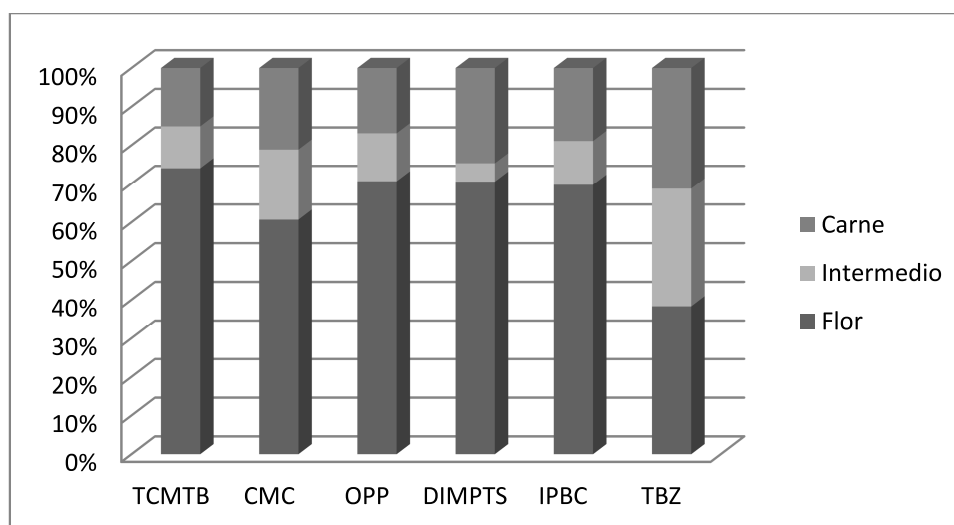


Gráfico 2. Distribución de fungicidas en las capas de piel wet blue

4.2.1.3 Determinación de la toxicidad de los baños residuales de curtición

Se determinó la toxicidad de un baño sin fungicidas añadidos (blanco o de referencia), y se comparó con la toxicidad producida por los baños de curtición en la que se habían añadido los productos estudiados. La mayor toxicidad la presentó el TCMTB, una de las grandes problemáticas que siempre ha acompañado a este producto. Los tres fungicidas propuestos

como alternativos presentaron una toxicidad mucho más baja, igual que la mezcla de fenólicos, destacando que el resultado de la toxicidad producida por el baño con IPBC es igual a la que presentó el baño sin fungicida. (Gráfico 3)

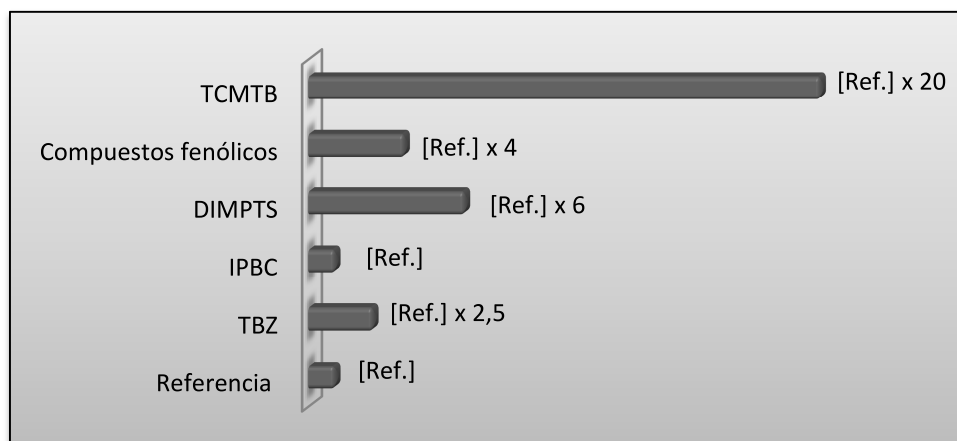


Gráfico 3. Comparación de la toxicidad de los baños respecto al blanco

4.2.2 Engrase de piel vegetal



Imagen 3. Aspecto de la piel vegetal engrasada, utilizando los distintos fungicidas

A simple vista, ninguna de las partes presentaba manchas ni decoloraciones (Imagen 3). Todas ellas mostraron un perfecto tacto y acabado.

4.2.2.1 Control de crecimiento de hongos en piel vegetal

Después de observar los resultados obtenidos para piel wet blue (*ver 4.2.1.1.*), se decidió no aplicar el TBZ ni la mezcla de compuestos fenólicos. Los resultados para DIMPTS e IPBC

fueron comparados con los obtenidos utilizando TCMTB. En la Tabla 8 se incluyen los valores de invasión en la piel y la zona de inhibición.

FUNGICIDA	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Trichoderma harzianum</i>		QF01		QF02		LL01	
	CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)
TCMTB	40	0	9	0	100	0	1	7	77	0
DIMPTS	0	7	0	7	0	2	0	10	0	3
IPBC	0	15	0	13	0	3	0	19	0	6
CONTROL	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0

Tabla 8. Resultados de Crecimiento en Superficie (CS) y de Zona de Inhibición (ZI) observados en las diferentes muestras de piel vegetal, transcurridos 20 días de control.

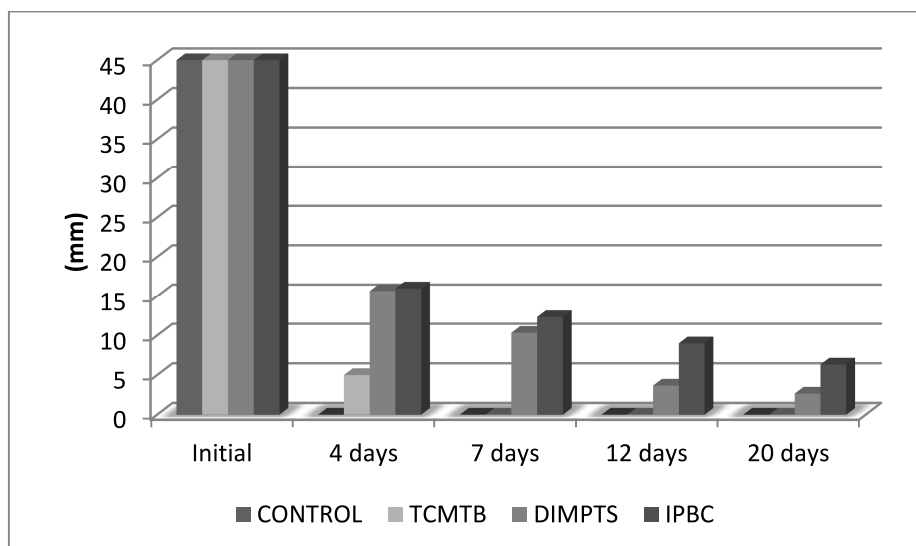


Gráfico 4. Evolución de la Zona de Inhibición del LL01 durante 20 días, sobre piel vegetal

La Imagen 4 muestra claramente la diferencia entre los fungicidas propuestos y el TCMTB. Después de 20 días de incubación, el DIMPTS y el IPBC revelan un mayor poder antifúngico, mientras que, transcurridas dos semanas, las cepas invadían la piel tratada con TCMTB. El Gráfico 4 ayuda a ver la evolución de la zona de inhibición, y se aprecia como esta zona de protección, para el control y el TCMTB desaparece en los primeros días.

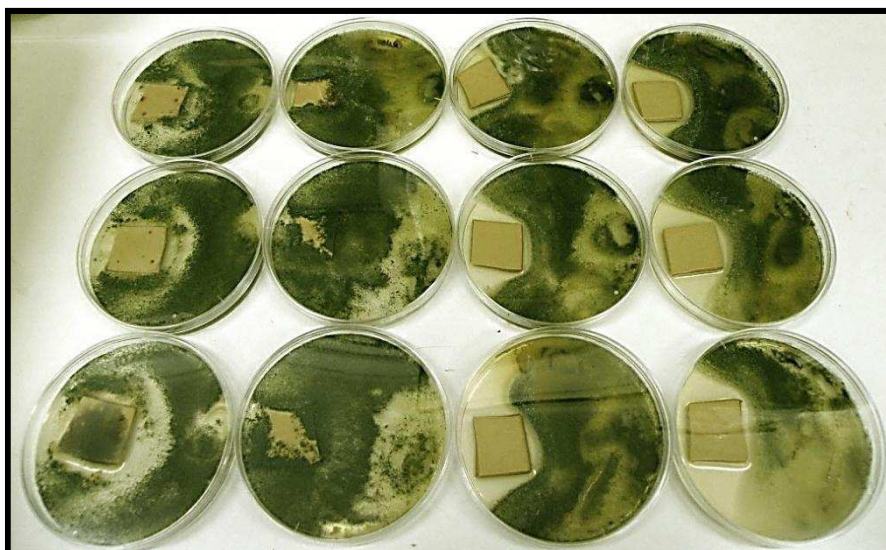


Imagen 4. Control de crecimiento de hongos *LL01* sobre piel vegetal después de 20 días de incubación. Columna de izquierda a derecha: Control, TCMTB, DIMPTS, IPBC. Cada prueba por triplicado.

Los cueros al vegetal son más difíciles de proteger frente al crecimiento de hongos que los cueros al cromo, debido a que los agentes curtientes vegetales (polifenoles combinados con hidratos de carbono) ofrecen a los hongos un nutriente directo en forma de azúcares simples.

4.2.2.2 Determinación de fungicida en la piel vegetal

Para la piel vegetal engrasada se determinó la cantidad de producto fungicida en ella, y el que menos contenido mostró fue el IPBC, que por el contrario, es el que mayor poder antifúngico posee. La Tabla 9 muestra la relación de cantidades expresadas en mg sobre kg de piel húmeda.

Piel curtida al vegetal	TCMTB	DIMPTS	IPBC
mg fungicida/kg piel húmeda	373	444	211

Tabla 9. Contenido de fungicida en piel vegetal

Según Hauber (16), para una protección efectiva en caso de un almacenaje prolongado de piel wet blue tratada con fungicidas, ésta debería contener un mínimo de 250 ppm de TCMTB.

4.2.3 Píquel de conservación

4.2.3.1 Control de crecimiento de hongos en piel piquelada

En un píquel de conservación siguen produciendo mejor respuesta los fungicidas DIMPTS e IPBC frente al TCMTB. Aunque la cantidad de fungicida añadido no fue suficiente para evitar la contaminación de las muestras a los 90 días de incubación, sí que fue suficiente, en el caso de los fungicidas alternativos, para impedir que la superficie de las pieles tratadas quedara totalmente cubierta por hongos. En la Tabla 10 se puede apreciar la similitud entre los resultados obtenidos con la muestra sin fungicida (control) y los obtenidos con TCMTB.

FUNGICIDA	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Trichoderma harzianum</i>		QF01		QF02		LL01	
	CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)
TCMTB	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
DIMPTS	6	0	33	0.7	35	0	57	0	1.7	4
IPBC	5	0.7	95	0	90	0	90	0	0	7
CONTROL	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0

Tabla 10. Resultados de Crecimiento en Superficie (CS) y de Zona de Inhibición (ZI) observados en las diferentes muestras de piel piquelada, transcurridos 90 días de control.

El Gráfico 5 muestra la evolución de la zona de inhibición frente a la cepa de *Trichoderma harzianum*. Se observa claramente mejor respuesta de los fungicidas alternativos frente al TCMTB. Con una cantidad ligeramente mayor de fungicida posiblemente se hubiera podido hacer frente a los 90 días de protección para el DIMPTS y el IPBC.

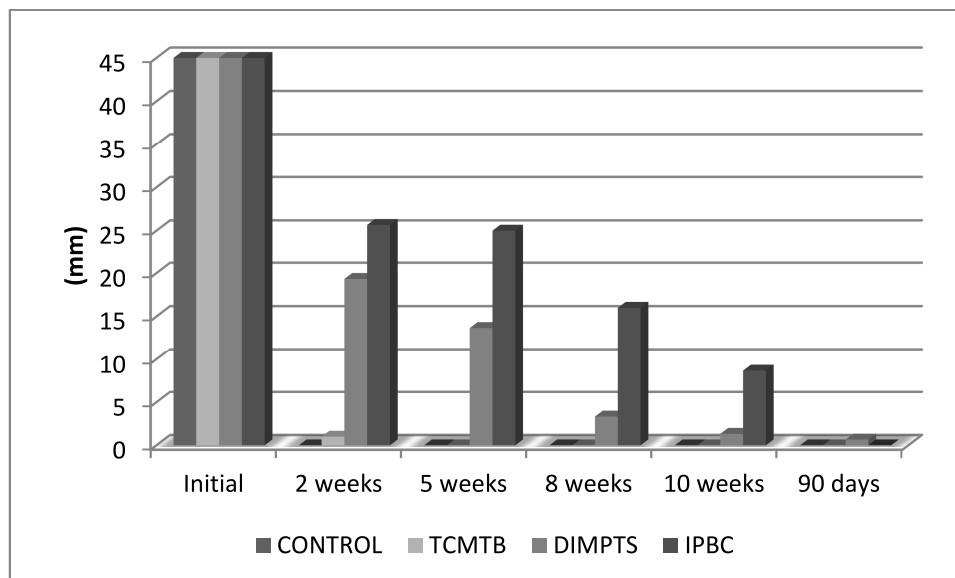


Gráfico 5. Evolución de la Zona de Inhibición del *Trichoderma harzianum* durante 90 días

La Imagen 5 es un claro ejemplo de lo ocurrido con este tipo de piquel de conservación, en el caso del *Aspergillus niger*.

90 días	CONTROL	TCMTB	DIMPTS	IPBC
<i>Aspergillus niger</i>				

Imagen 5. Control de crecimiento de hongos *Aspergillus niger* sobre piel piquelada después de 90 días de incubación

5. CONCLUSIONES

Los fungicidas propuestos como alternativos demuestran una eficacia mayor que los productos usados normalmente en el sector, tanto para las cepas adquiridas de la CECT como para las cepas aisladas de fábricas de curtidos. Estas cepas recogidas e identificadas revelan mayor resistencia a cualquier ataque fungicida ya que son resultantes de sobrevivir a un proceso de curtición, seguramente tratado con los fungicidas comunes, por tanto, con una resistencia adquirida a estos productos.

Una mayor capacidad antifúngica del diiodometil-p-tolilsulfona (DIMPTS) y del 3-iodo-2-propynyl butylcarbamate (IPBC) en diferentes tipos de procesos; curtición wet blue, engrase vegetal y píquel de conservación, junto con los resultados obtenidos en un trabajo anterior (7) aseguran fiabilidad para utilizarlos en una amplia variedad de operaciones.

Otro de los fungicidas propuesto como alternativo, el tiabendazol (TBZ), no posee suficiente capacidad antifúngica para evitar la contaminación en todo tipo de muestras ensayadas en este trabajo. Según la distribución estratigráfica de los fungicidas en la piel wet-blue, este último se distribuye uniformemente en las tres capas, mientras que los otros compuestos fungicidas se distribuyen aproximadamente un 60-70 % en la capa de flor, un 10 – 20 % en la capa intermedia y un 25 – 30 % en la capa de carne, resultados que están de acuerdo con la bibliografía, Es posible que una protección mayor en el exterior de la piel evite la entrada de las esporas en la misma.

Una de las mayores problemáticas que presenta el 2-(tiocianometiltio) benzotiazol (TCMTB) se confirmó al determinar la toxicidad de los baños, ya que fue éste el que presentó un valor más elevado. El IPBC es el que produce menor toxicidad en las aguas residuales y coincide con el que mayor capacidad antifúngica posee. Para la piel vegetal engrasada en la que se añadió IPBC fue en la que se determinó la menor cantidad de fungicida.

Es importante destacar que los fungicidas propuestos no producen manchas en la piel ni ningún otro tipo de defectos, como se pudo comprobar en los artículos de piel vegetal engrasada, y con una cantidad mínima son capaces de evitar el crecimiento de moho durante los días que permanecen almacenadas.

En un píquel de conservación siguen produciendo mejor respuesta los fungicidas DIMPTS e IPBC frente al TCMTB. Aunque la cantidad de fungicida añadido no fue suficiente para evitar la contaminación de las muestras a los 90 días de incubación, sí que fue suficiente, en el caso de los fungicidas alternativos, para impedir que la superficie de las pieles tratadas quedara totalmente cubierta por hongos.

6. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia e Innovación la financiación económica obtenida a través del Proyecto CTQ2009-08347/PPQ.

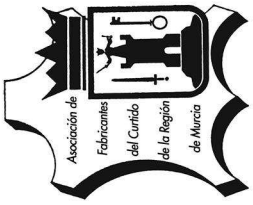
7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Orlita, A.; “Microbial biodeterioration of leather and its control: a review”; *International Biodeterioration and Biodegradation*; 53, p. 157-163 (2004)
- (2) Russel, Pinchuck and Cooper; “Fungicide Evaluation for the protection of wet blue hides”; *JSLTC*, vol. 69, p. 135-140.
- (3) Amanda Bugby; “The practical evaluation of fungicides”; *JSLTC*, vol. 71, p. 138-141
- (4) Binnur Meriçli Yapici, Ismail Karaboz; “The effect of two anti-fungal compounds on the growth of molds that frequently appear on tanned leather”; *JALCA*, vol. 92, 1997, p. 38-45
- (5) Padoan, K.; “New generation of fungicides for leather preservation”; *Proceedings del II Eurocongress of the International Union of Leather Technologists and Chemists Societies (IULTCS)*, mayo 2006, Estambul
- (6) Galloway; “Fungicides for treating wet blue hides” *JSLTC*; vol. 58, p. 67
- (7) Cuadros S., Manresa M., Font J., Bautista ME., Maldonado F., Marsal A.; “Alternative Fungicides: comparative study with conventional chemicals”; *JSLTC*; vol. 95-6, p. 263-269, nov-dic. 2011
- (8) Seguer, J., Beltrán, M^a T.; “Productos biocidas notificados en la Directiva 98/8/CE en el sector de curtición”; *Proceedings 52º Congreso AQEIC*, Lorca, abril 2003, p. 37-47

- (9) Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de febrero de 1998; Official Journal of the European Communities de 24 de abril de 1998; p. L123/1 – L123/63
- (10) “Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) = 2000 Copyright by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI, 6, p. 509-515
- (11) Jennifer M. Andrews; “Determination of minimum inhibitory concentrations”; Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2001) 48, Suppl. S1, 5-16.
- (12) ASTM D 4576-01; “Standard Test Method for Mold Growth Resistance of Wet Blue”
- (13) ISO/DIS 13365; Leather – Chemical Tests – “Determination of the preservative (TCMTB, CMK, OPP, OIT) content in leather”
- (14) UNE EN ISO 11348-3:2009; Calidad del agua. “Determinación del efecto inhibidor de muestras de agua sobre la luminiscencia de *Vidrio fischeri* (ensayo de bacterias luminiscentes). Parte 3; Método utilizando bacterias liofilizadas”
- (15) Hauber, C.; “Microbicide applications in the leather industry”, En: Paulus, W. (Ed), Directory of microbicides for the protection of materials, Springer, Berlin, p. 317-324
- (16) Hauber, C.; “The addition of fungicides in chrome tannage and their penetration absorption and distribution in the wet-blue”; World leather, May 1997, p.75-82.



Highly creative



LANXESS
Energizing Chemistry



ceclor
Confederación Comarcal de Organizaciones
Empresariales de Lorca



Leather Innovation
Càtedra A3 UPC



Pulcra Chemicals
The solution specialist



PROGRAMA



62 CONGRESO DE LA
ASOCIACIÓN QUÍMICA
ESPAÑOLA DE LA
INDUSTRIA DEL CUERO

10 y 11 de mayo de 2013 Lorca

ASAMBLEA GENERAL EXTRAORDINARIA

Viernes, 10 de Mayo

Sesión de tarde

ASAMBLEA DE SOCIOS

17,30 - 18,00 Recepción y registro de asistentes

18,00 - 20,00 Junta General. Lectura del resultado de las votaciones y proclamación de los resultados.

Sábado, 11 de Mayo

Sesión de mañana

JORNADA TÉCNICA

Presidentes de la sesión: Sr. Luis Labastida Azemar y Sr. Juan Pérez Gil

9,00 - 9,45 Recepción, registro de asistentes y entrega de documentación.

9,45 - 10,15 Ceremonia de apertura del 62 Congreso.

10,15 -10,45 "Lorca: pasión, desgracia, esperanza. Bienvenidos"

Sr. Gerónimo Gil Arcas

10,45 – 11,05 "Influencia de la recurtición con sintanes en la tintura del cuero"

Autores: Olga Ballús y Ramón Palop

11,05 – 11,25 "Fungicidas alternativos para la industria de la piel: DIMPTS e IPBC"

Autores: Sara Cuadros, Joaquim Font, M^a A. Manresa, Agustí Marsal y Lluís Ollé

11,25 – 11,45 PAUSA – CAFÉ

Presidentes de la sesión: Sr. Gerónimo Gil Arcas y Dr. Agustín Marsal Monge

11,45 – 12,05 "Caracterización por microextracción en fase sólida de compuestos orgánicos volátiles en piel"

Autores: Rosa Cuadros, Joaquim Font, Lluís Ollé, Anna Bacaradit y Agustí Marsal

12,05 – 12,25 "Alternativas ambientales a los procesos de rendido y engrase."

Autores: M.Roig, V.Segarra, J.Ferrer y M.A. Martínez

12,25 – 12,45 "Aplicación de ultrasonidos en curtiición vegetal"

Autores: Felip Combalia, Josep Morera y Esther Bartoli

12,45 – 15,15 ALMUERZO DE TRABAJO

Sesión de tarde

Presidentes de sesión: Dr. Lluís Ollé Otero y Sr. José Ramón Martínez Pardo

15,15 – 15,35 "Aplicación de taninos sostenibles con baja huella de carbono"

Autores: Jorge Gerardo Díaz, Concepció Casas, Teresa Mir, Lluís Ollé y Anna Bacaradit

15,35 – 15,55 "Curtidos: residuos y legislación"

Sra. Luz Gil Jodar

15,55 – 17,00 COLOQUIO

PROGRAMA PARA ACOMPAÑANTES

Día 11 mayo de 2013

10 horas : Recogida en hoteles con microbus.

10,30 horas : Reunión en Plaza de España.

10,35 horas : Recorrido por el casco antiguo, Palacio de Guevara, museos de bordados del paso blanco y paso azul, subida al castillo, con visita a la sinagoga y demás instalaciones.

La subida al castillo se realizará en el tren turístico.

13,00 horas : Vuelta a la Plaza de España.

13,30 horas : Almuerzo en el restaurante "La Cofradía", junto a los congresistas.

Tarde libre.

A elección se puede visitar la llamada zona cero en donde los terremotos del

11 marzo de 2011 fueron más devastadores.

21,00 horas. Cena de Clausura en el Parador Castillo de Lorca .

Entrega Premio AQEIC 2013

FUNGICIDAS ALTERNATIVOS PARA LA INDUSTRIA DE LA PIEL. DIMPTS e IPBC

Sara Cuadros¹, Joaquim Font², M^a Àngels Manresa³, Agustí Marsal¹, Lluís Ollé²

¹ Departamento de Tecnología Química y Tensioactivos, IQAC, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Barcelona, Spain; Teléfono 93 400 61 55; ammeco@iiqab.csic.es

² Escola d'Enginyeria d'Igualada, EEI, Universitat Politècnica de Catalunya, (UPC), Igualada, Spain, teléfono 93 803 53 00; joaquim.font@eei.upc.edu

A3 CHAIR IN LEATHER INNOVATION, Igualada, Spain

³ Facultat de Farmàcia, Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain.

FUNGICIDAS ALTERNATIVOS PARA LA INDUSTRIA DE LA PIEL. DIMPTS e IPBC

RESUMEN

La industria de curtidos tiene una necesidad continuada de adaptar sus procesos a tecnologías alternativas de menor impacto ambiental. El uso de fungicidas es un elemento imprescindible, y la legislación medioambiental, cada vez más estricta, conduce a la búsqueda de nuevos sistemas fungicidas que cumplan con dicha normativa.

Se evaluó la capacidad fungicida de dos productos antifúngicos propuestos como alternativos, diiodometil-p-tolilsulfona DIMPTS y 3-iodo-2-propinil butilcarbamato IPBC, y se comparó con la del 2-(tiocianometiltio)-1,3-benzotiazol, TCMTB, compuesto usado convencionalmente en el sector. Esta capacidad fungicida se evaluó frente a diferentes cepas de hongos y en distintos procesos. Se aplicaron diferentes cantidades de DIMPTS e IPBC a una curtición al cromo de piel vacuna y a un engrase de piel vegetal. Los estudios posteriores consistieron en un control microbiológico de inoculación de las muestras, con hongos comunes en curtidos, determinación del contenido de fungicida en la piel, total y estratigráfico, y un estudio de toxicidad de las aguas residuales de cada proceso.

Se confirma la eficacia del DIMPTS y del IPBC, comprobada en trabajos anteriores, al aplicar distintas cantidades de producto en los dos tipos de curticiones. De esta manera se optimiza la cantidad necesaria de cada producto frente a diferentes cepas de hongos.

La distribución estratigráfica en los distintos tipos de piel (wet blue y vegetal) también es distinta. La toxicidad de los baños residuales fue menor en el caso de los productos propuestos como alternativos frente al TCMTB.

Palabras clave → *fungicidas alternativos, cepas de hongos, wet blue, piel vegetal toxicidad*

ALTERNATIVE FUNGICIDES FOR THE LEATHER INDUSTRY. DIMPTS and IPBC

ABSTRACT

Leather industry has a continuous need to adapt their processes to alternative technologies with less environmental impact. The use of fungicides is an essential element, and environmental legislation becoming stricter, leading to the search for new fungicides systems that comply with that law.

The fungicidal capacity of two alternative compounds, diiodometil p-tolylsulfone DIMPTS, 3-iodo-2-propynyl butylcarbamate IPBC, was compared to 2-(thiocianometilthio)-1,3-benzothiazole TCMTB, one of the conventional fungicides in tannery. This fungicidal capacity was evaluated against different strains of fungi in different processes. Different amounts of fungicides were applied in the chrome tanning process and a fatliquoring process of hides tanned with vegetable extracts. Further studies consisted in a microbiological control samples inoculated with fungi common in tannery, determination of the fungicide content on the hides, total and stratigraphic, and a toxicity study of process wastewater.

The effectiveness of DIMPTS and IPBC, verified in previous works, is confirmed when different amounts of fungicide are applied. Consequently, the amount of each fungicide against different strains of fungi can be optimized.

The stratigraphic distribution in different strains of leather (wet blue and vegetable) is also different. The toxicity of wastewater was lower in the case of the alternative fungicides with respect to TCMTB.

Keywords → *alternative fungicides, strains of fungi, wet blue, vegetable leather, toxicity*

1. INTRODUCCIÓN

En la fabricación del cuero, tanto las pieles curtidas como las no curtidas corren el riesgo de ser atacadas por una gran variedad de microorganismos. Los procesos de las tenerías ofrecen muchas posibilidades de crecimiento microbiano: procesado de pieles frescas, uso de enzimas, emulsiones grasas y uso de productos naturales para operaciones de curtición y acabado. Otros factores como el almacenaje prolongado y el transporte de las pieles en estado wet blue o piqueladas incrementan las posibilidades de crecimiento microbiano.

Las pieles sujetas a los correspondientes pasos de producción, como el píquel, la curtición, la tintura o el engrase son susceptibles al ataque de hongos. Para estas pieles es necesaria la adición de un fungicida efectivo para evitar el crecimiento de hongos. La búsqueda de fungicidas alternativos eficaces en estas operaciones es el tema en que se basa este estudio.

Las pieles que son atacadas por hongos se evidencian por la presencia de manchas permanentes y daños en las propiedades físicas debido a la degradación del colágeno. Las condiciones óptimas para el crecimiento de un gran número de cepas son: un rango de pH entre neutro y ligeramente ácido (3-6), una temperatura de 25°C y una humedad ambiental entre 12 y 15%. La piel wet blue proporciona las condiciones óptimas para crecimiento de hongos: temperatura de almacenaje, pH ácido, presencia de agua, proteínas y grasas. Las esporas de los hongos sobreviven en medio seco, desarrollándose al recuperar las condiciones óptimas. (1)

De acuerdo con Hauber (2), para que un compuesto sea efectivo como fungicida son necesarios los siguientes requerimientos: actividad óptima frente a un alto número de hongos, compatibilidad con la piel y con los productos químicos utilizados en el proceso de curtición, efectividad a pH ácido, estabilidad respecto a la temperatura y a la luz UV, baja solubilidad en agua, baja toxicidad en humanos y aceptable económica y medioambientalmente.

El 2-(tiocianometiltio)-1,3-benzotiazol (TCMTB) se desarrolló como un fungicida innovador hacia los años 70 y aún persiste actualmente. Pero la legislación medioambiental cada vez más estricta hace que se continúen buscando alternativas a este producto. (3)

A pesar de que se ha propuesto investigar un gran número de compuestos que cumplieran en mayor o menor medida todos estos requerimientos, el TCMTB es el que posee un rango de aplicación más elevado y es el que ha alcanzado el nivel más alto de uso en la industria de la piel. No obstante, sus limitaciones técnicas y el considerable impacto medioambiental de la molécula refuerzan la necesidad de buscar nuevos fungicidas para sustituir los utilizados convencionalmente.

En trabajos previos (4,5) se compararon fungicidas de uso común en curtidos con otros compuestos propuestos como alternativos, y se concluyó que dos de ellos (diiodometil-p-tolilsulfona, DIMPTS y el 3-iodo-2-propinil butilcarbamato, IPBC) ofrecen una satisfactoria resistencia a las muestras de piel wet blue tratadas con estos productos, y por tanto se proponen como una buena alternativa para trabajar en la industria de curtidos. Estos compuestos se seleccionaron de acuerdo con los productos notificados y registrados en la Directiva 98/8/CE. Para poder confirmar los resultados obtenidos, se deberán abordar más estudios con un mayor abanico de cepas y en distintas condiciones.

2. OBJETIVOS

El trabajo se centra en la búsqueda de productos fungicidas de mayor eficacia frente un amplio espectro de hongos, de menor toxicidad y de menor impacto medioambiental, como alternativas a los productos convencionalmente usados en la industria de curtidos.

El objetivo principal es evaluar la capacidad fungicida de dos compuestos seleccionados, el diiodometil-p-tolilsulfona, DIMPTS, y el 3-iodo-2-propinil-N-butilcarbamato, IPBC, (compuestos notificados y registrados en la Directiva 98/8/CE (6,7)) frente a diferentes cepas de hongos y en diferentes situaciones. La capacidad fungicida de estos compuestos se comparará con la del 2-(tiocianometiltio)-1,3-benzotiazol, TCMTB, fungicida usado habitualmente en tenería.

En esta parte del trabajo se pretende estimar la cantidad mínima necesaria de los fungicidas propuestos para aplicar en dos curticiones distintas y que confiera la suficiente capacidad antifúngica para prevenir el ataque de los hongos escogidos. Se añadirán diferentes cantidades de fungicida a dos procesos distintos: a) una curtición al cromo de piel vacuna, b) un engrase de piel curtida con extractos vegetales.

Los análisis posteriores consistirán en realizar un control microbiológico de inoculación de la piel, con cepas comunes en curtidos y la determinación total y estratigráfica de la cantidad de fungicida restante en la piel.

Para los análisis de crecimiento se utilizarán cepas de hongos adquiridas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia y cepas aisladas de fábricas de curtidos.

La determinación de la toxicidad de las aguas residuales en cada uno de los dos casos propuestos complementará los estudios anteriores.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Material

Se evaluó la eficacia de dos compuestos fungicidas propuestos como alternativos, utilizando siempre un producto de referencia de uso común en el sector. La relación de fungicidas se muestra en la Tabla 1 (todos ellos, productos notificados y registrados en la Directiva 98/8/CE) (6,7)

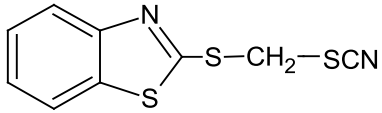
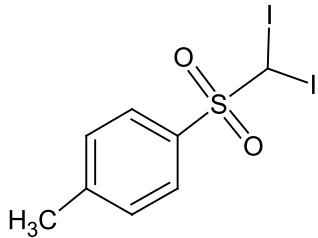
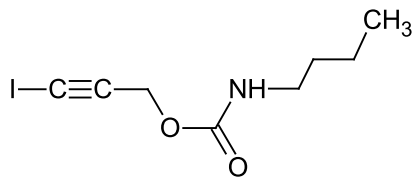
	FUNGICIDA	ESTRUCTURA QUÍMICA
Fungicida de uso común en el sector	2-(tiocianometiltio)-1,3-benzotiazol TCMTB (~ 30% principio activo)	
Fungicidas propuestos como alternativos	Diodometil-p-tolilsulfona DIMPTS (~ 40% principio activo)	
	3-iodo-2-propinil-N-butilcarbamato IPBC (~ 30% principio activo)	

Tabla 1. Detalles de los fungicidas utilizados para este estudio

La eficacia de estos productos se evaluó frente al crecimiento de diferentes cepas de hongos comunes en tenería. Cuatro de ellas obtenidas de la CECT; *Aspergillus niger*, *Trichoderma harzianum*, *Penicillium funiculosum*, *Alternaria alternata*, que se recibieron liofilizadas (excepto la *Alternaria alternata* que se recibió en cultivo) y se hicieron crecer en un nutriente agar adecuado hasta la obtención de esporas viables. Las tres cepas restantes fueron rescatadas de contaminaciones en fábricas de curtidos, a las que nombramos como *QF01*, *QF02* y *LL01*, y que se aislaron utilizando nutriente adecuado, para su posterior identificación por la CECT. Una vez identificadas, vimos que se trataba de las siguientes especies:

- *QF01* – *Penicillium spinulosum*
- *QF02* – *Penicillium decumbens*
- *LL01* – *Trichoderma harzianum*

Con solución salina al 85%, se obtuvo una suspensión de esporas de cada cepa, y se realizó un recuento (con microscopio y sobre placa) para controlar la cantidad de esporas/mL en el momento de hacer las siembras.

Los medios de cultivo para desarrollar el crecimiento de hongos en placa, fueron los siguientes; agar dextrosa saboraud y agar dextrosa patata.

La Imagen 1 muestra el aspecto de los hongos seleccionados para este estudio.



Imagen 1. Aspecto de los hongos seleccionados sobre placa (triplicado). De izquierda a derecha: *Aspergillus niger*, *Trichoderma harzianum*, *Penicillium funiculosum*, *Alternaria alternata*, *Trichoderma harzianum* - LL01, *Penicillium spinulosum* - QF01, *Penicillium decumbens* - QF02

3.2. Determinación de la Concentración Mínima de Inhibición (CMI)

La cantidad mínima de fungicida necesaria para inhibir el crecimiento visible de un microorganismo, expresada en $\mu\text{g/mL}$, proporciona la CMI. Cada producto fungicida presenta una CMI distinta frente a cada tipo de hongo (8).

Para determinar la CMI se siguió la norma ASTM D 4576-01 (Standard Test Method for Mould Growth Resistance of Wet Blue); según este método se prepara un rango de diluciones entre $10240\mu\text{g/mL}$ hasta $0.078\mu\text{g/mL}$ de cada fungicida, y se evalúa qué dilución inhibe el crecimiento de hongos sembrados. (9)

La CMI de los fungicidas nombrados frente a las cepas de hongos descritas se realizó en los trabajos anteriores (4,5). En este artículo se incluyen los resultados para observar la capacidad antifúngica de los productos escogidos frente a las cepas.

3.3. Aplicación de diferentes cantidades de fungicida en dos tipos de curticiones; curtición piel wet blue y engrase de piel vegetal

En los dos casos, se partió de cuero de piel vacuna de 32kg+, procedente de Francia y la aplicación se realizó en bombos de laboratorio.

Antes de empezar las pruebas, se efectuó una extracción de cada piel con acetonitrilo, para determinar posibles restos de fungicidas de procesos anteriores con el cromatógrafo de líquidos, para asegurarnos que no había productos residuales que nos interfirieran en los resultados.

En los dos casos, se fraccionó la piel a utilizar en nueve muestras iguales. Una muestra se reservó para aplicar cada proceso sin ningún producto antifúngico añadido (blanco-control). A las ocho muestras restantes se les aplicaron cuatro cantidades distintas (C1 – C4) de los dos compuestos fungicidas estudiados (DIMPTS e IPBC) tal y como se observa en la Tabla 2:

Muestra	Fungicida	Muestra	Fungicida
M1	C1 - DIMPTS	M5	C1 - IPBC
M2	C2 - DIMPTS	M6	C2 - IPBC
M3	C3 - DIMPTS	M7	C3 - IPBC
M4	C4 - DIMPTS	M8	C4 - IPBC

Tabla 2. Tratamientos con compuestos fungicidas aplicados en cada operación

3.3.1 Curtición de piel wet blue

Se partió de cuero piquelado, dividido en tripa a 3.3mm. Se curtió cada fracción en un bombo distinto según la receta mostrada en la Tabla 3.

Porcentaje sobre peso de piel piquelada	
60% H ₂ O	
4% cloruro de sodio	
4% sal de cromo 33% basicidad	Rodar 60'
(X/2) % fungicida	Rodar 60'
4% sal de cromo 33% basicidad	Rodar 3h
1% formiato de sodio	Rodar 3h
Noche en reposo	
Controlar el pH (entre 2,8 – 3)	
1.5% bicarbonato de sodio	Rodar 90'
Controlar el pH (entre 3,5 – 4)	
(X/2) % fungicida	Rodar 60'
Ecurrir - vaciar	
100% H ₂ O	Rodar 15'
Ecurrir - vaciar	

Tabla 3. Curtición piel wet blue

Las distintas cantidades de fungicida añadido (X) se muestran en la Tabla 4.

Muestra	Fungicida	Muestra	Fungicida	% fungicida
M1	C1 - DIMPTS	M5	C1 - IPBC	0.12
M2	C2 - DIMPTS	M6	C2 - IPBC	0.16
M3	C3 - DIMPTS	M7	C3 - IPBC	0.20
M4	C4 - DIMPTS	M8	C4 - IPBC	0.24

Tabla 4. Distintas cantidades de fungicida añadido en la curtición wet blue

De cada ejemplar curtido se guardó:

- Una muestra húmeda para observar el crecimiento de hongos en la piel. Conservada a 4°C.
- Una muestra seca para poder determinar el contenido de fungicida en la piel. Conservada a temperatura ambiente.

3.3.2 Engrase de piel vegetal

Se partió del mismo tipo de cuero piquelado que en el estudio anterior, el cual fue curtido con extractos vegetales siguiendo la receta de la Tabla 5. Una vez fraccionada en nueve muestras, cada una de ellas fue engrasada de acuerdo con la receta de la Tabla 6.

Porcentaje sobre peso de piel tripa	
4 % Extracto de mimosa	
1 % Dispersante naftalen sulfónico	
0.18 % Bicarbonato de sodio	
0.26 % Engrasante sulfatado	Rodar 2h
30 % H ₂ O (a 35°C)	
6 % Extracto de mimosa	Rodar 2h
10 % Extracto de mimosa	
0.5 % Dispersante naftalen sulfónico	Rodar 12h
0.4 % Ácido oxálico	
0.4 % EDTA disódico	
50 % H ₂ O	Rodar 1h
Ecurrir baño – vaciar	
200 % H ₂ O	Rodar 20'
Ecurrir baño – vaciar	
Descargar piel	
Ecurrir piel	

Tabla 5. Fórmula del proceso de curtición vegetal

Porcentaje sobre peso escurrido	
70 % H ₂ O (55°C)	
4,30 % Engrase sulfatado	
1 % Engrase sulfitado	
X % Fungicida	
0,45 % EDTA disódico	Rodar 60'
0,17% Ácido oxálico	Rodar 25'
Ecurrir – vaciar	
160% H ₂ O	Rodar 1'
Ecurrir – vaciar	

Tabla 6. Fórmula del proceso de engrase de la piel vegetal

Las distintas cantidades de fungicida añadido se muestran en la Tabla 7.

Muestra	Fungicida	Muestra	Fungicida	% fungicida
M1	C1 - DIMPTS	M5	C1 - IPBC	0.02
M2	C2 - DIMPTS	M6	C2 - IPBC	0.04
M3	C3 - DIMPTS	M7	C3 - IPBC	0.06
M4	C4 - DIMPTS	M8	C4 - IPBC	0.08

Tabla 7. Distintas cantidades de fungicida añadido en el engrase de piel vegetal

De cada ejemplar, se reservaron las mismas piezas que en el caso anterior:

- Una muestra húmeda para observar el crecimiento de hongos en la piel. Conservada a 4°C.
- Una muestra seca para poder determinar el contenido de fungicida en la piel. Conservada a temperatura ambiente.

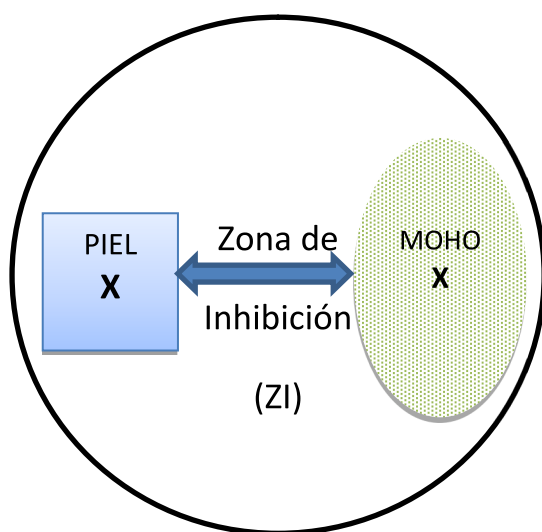
3.4 Control de crecimiento de hongos

Se realizó un control de crecimiento de hongos en cada piel tratada con las diferentes cantidades de DIMPTS e IPBC frente a tres cepas escogidas. Dos de ellas adquiridas de la CECT y una aislada de fábrica. Se efectuó el estudio por triplicado, sobre placas estériles con medio de cultivo agar de patata, tal y como indica la norma ASTM D4576-01 (10). El crecimiento se controlaba frente a un blanco-control, una piel de las mismas características que el resto, pero sin producto fungicida añadido.

Se estudió el comportamiento del *Aspergillus niger*, el *Trichoderma harzianum*, y del *QF01*, que corresponde al *Penicillium spinulosum*. Se colocaron las muestras en placas, rodeadas de medio de cultivo que se dejó solidificar, y se añadieron 2 gotas de solución de esporas (del orden de 10^5 esporas/mL de concentración) de cada hongo escogido; una encima de la piel y otra encima del cultivo (Figura 1).

Se almacenaron las placas a 26°C, en atmósfera húmeda y semanalmente se hizo la lectura de resultados frente al blanco-control hasta un máximo de 90 días. En el caso de la piel curtida al vegetal, el control se realizó durante 30 días, debido a que las pieles en este estado no necesitan resistir los ataques más de dos o tres semanas.

Para evaluar los resultados obtenidos en este estudio se observó el crecimiento de moho en las muestras tratadas, depositadas en las placas de cultivo. De acuerdo con la norma ASTM D 4576-01 (10), el informe de los resultados del crecimiento de moho debe incluir el porcentaje de superficie cubierta por hongos. Para precisar los resultados en las muestras en las que el porcentaje de crecimiento sobre la piel fue del 0%, se introdujo el parámetro de la “Zona de inhibición” (ZI) (Figura 1), que se define como la distancia (mm), alrededor de la muestra, dónde el fungicida, debido a su efecto radiante, inhibe el crecimiento de moho.



**Figura 1. Ejemplo con las localizaciones de la inoculación (X).
Zona de inhibición (ZI) provocada por el fungicida contenido en la piel.**

3.5 Determinación del fungicida en la piel

3.5.1 Contenido total de fungicida

Las muestras de piel destinadas a la determinación de fungicida se dejaron secar a temperatura ambiente y se trituraron para obtener polvo de piel, y hacer la determinación de fungicida por cromatografía líquida. El análisis se realizó siguiendo la norma ISO/DIS 13365 (11), para la determinación de fungicidas en piel, y adaptándola a los fungicidas aquí ensayados. Constaba de una primera parte de extracción del producto con ultrasonidos con el disolvente adecuado y su posterior determinación en el cromatógrafo HPLC. El disolvente utilizado fue acetonitrilo en todos los casos.

3.5.2 Contenido estratigráfico de fungicida

Paralelamente a estos estudios, se realizó una curtición wet blue y un engrase de piel vegetal (siguiendo las mismas formulaciones descritas en la Tabla 3 y en las Tablas 5 y 6) añadiendo un contenido de fungicida común en este tipo de procesos. La piel obtenida, se dejó secar a temperatura ambiente y se dividió en tres capas: flor, intermedio y carne. Se trituró cada una de ellas y se determinó el contenido de fungicida. De esta manera se pudo comprobar la distribución estratigráfica de cada producto en la piel y para cada proceso.

En cada uno de los fungicidas estudiados (TCMTB, DIMPTS e IPBC), en el caso de la curtición wet blue se le añadió un 0.2% de fungicida, y en el engrase de piel vegetal un 0.04% de producto antifúngico.

3.6 Determinación de la toxicidad de los baños residuales de curtición

Se reservaron los baños de los procesos aplicados en el apartado 3.5.2 para determinar la toxicidad de las aguas residuales. Se determinó la toxicidad según la norma de calidad del agua UNE EN ISO 11348-3:2009, utilizando el método Microtox (12). De esta manera se pudo comparar el impacto medioambiental que suponían los fungicidas alternativos respecto al TCMTB.

El sistema Microtox® es un bioensayo que examina la toxicidad aguda de muestras medioambientales y compuestos puros basándose en la reducción de la bioluminiscencia natural de la bacteria marina *Vibrio fischeri* en presencia de agentes contaminantes. La toxicidad se expresa como la concentración de agente que produce la reducción del 50% de la luminiscencia inicial (EC50) (13).

4 RESULTADOS

4.1 Determinación de la Concentración Mínima de Inhibición (CMI)

Los resultados de la CMI de los productos fungicidas ensayados para cada una de las cinco cepas seleccionadas se muestran en la Tabla 8.

Fungicida	Cepas adquiridas				Cepas aisladas		
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	QF01	QF02	LL01
TCMTB	7.6	7.6	15.3	0.95	61	17	17
DIMPTS	3.8	7.6	1.9	1.07	7.6	15.2	15.2
IPBC	0.8	3.9	1.94	0.79	3.8	3.8	3.8

Tabla 8. Concentración Mínima de Inhibición (CMI) en $\mu\text{g/mL}$

Los fungicidas propuestos como alternativos demuestran una eficacia mayor que el TCMTB, tanto para las cepas adquiridas de la CECT como para las cepas aisladas de fábricas de curtidos. Estas cepas recogidas e identificadas revelan una resistencia adquirida a determinados productos frente a cualquier ataque fúngico, ya que son resultantes de sobrevivir a un proceso de curtición, seguramente tratado con los fungicidas comunes.

4.2. Aplicación de fungicida en dos tipos de curticiones; curtición piel wet blue y engrase de piel vegetal

4.2.1 Curtición wet blue. Control de crecimiento de hongos

La Tabla 9 muestra el porcentaje de crecimiento de moho sobre la piel wet blue y la zona de inhibición que crea el fungicida a su alrededor, para las distintas concentraciones de fungicida aplicado. Los estudios se realizaron por triplicado, y los valores de la tabla son la media de los tres casos.

Wet Blue		<i>Aspergillus niger</i>		<i>Trichoderma harzianum</i>		<i>QF01 - Penicillium spinulosum</i>	
DIMPTS		CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)
C0	Control	100	0	100	0	100	0
C1	0.12	0	21.7	0	12.7	0	18.3
C2	0.16	0	21	0	12	0	14
C3	0.20	0	20	0	15	0	14
C4	0.24	0	29	0	13.7	0	18
IPBC		CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)
C0	Control	100	0	100	0	100	0
C1	0.12	0	26.7	37	0	13.3	6
C2	0.16	0	45	0	12.3	0	20
C3	0.20	0	39.3	0	22.7	0	32
C4	0.24	0	45	0	19.7	0	37.7

Tabla 9. Resultados de Crecimiento en Superficie (CS) y Zona de Inhibición (ZI) para las muestras de piel wet blue, con diferentes concentraciones de fungicida (DIMPTS e IPBC), transcurridos 90 días de control.

Un crecimiento de moho en la piel, anula la zona de inhibición debido a que la muestra ya ha sido alcanzada por la cepa. Las muestras sin fungicida añadido quedaron completamente contaminadas dos semanas después de la siembra. En el caso del DIMPTS, la mínima concentración aplicada (un 0.12%) fue suficiente para inhibir el crecimiento de hongo sobre la piel. Frente al *Aspergillus niger*, también fue suficiente la mínima concentración añadida de IPBC (0.12%), en cambio, la inhibición del crecimiento del *Trichoderma harzianum* y del *Penicillium spinulosum* se alcanzó con la segunda concentración testada (un 0.16%).

La Imagen 2, es un claro ejemplo del control de crecimiento en las muestras donde se sembró la cepa *Trichoderma harzianum*. Cada columna corresponde a una concentración de IPBC distinta, ya que las pruebas se realizaron por triplicado. Se ha escogido esta imagen ya que se observa perfectamente como las diferentes concentraciones ejercen diferentes efectos frente a las cepas. Cuanto mayor es la concentración aplicada, mayor evita el crecimiento de hongos en la piel wet blue y evita que éstos crezcan alrededor, creando un efectivo halo de inhibición.

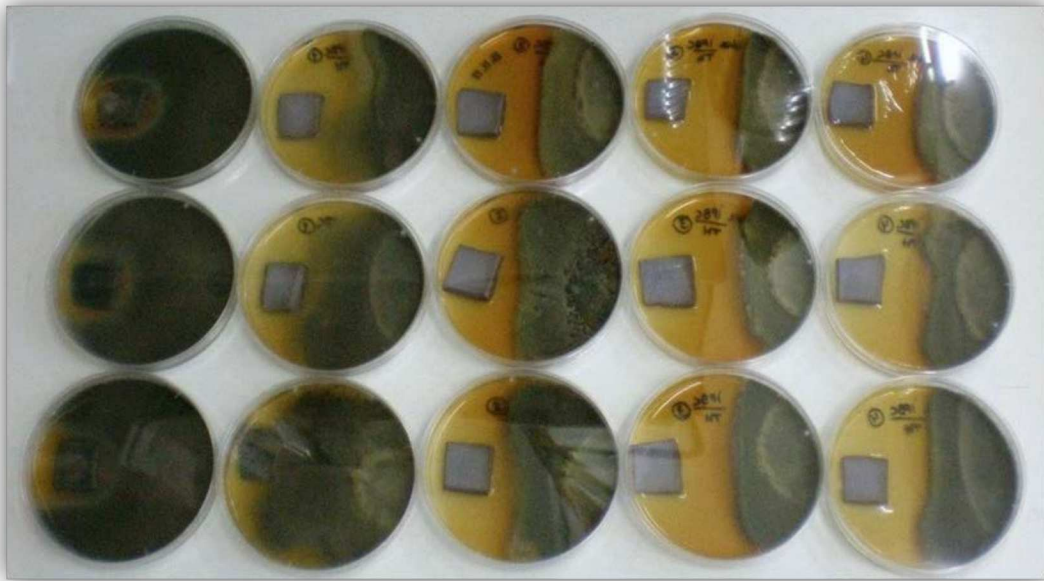


Imagen 2. Control de crecimiento del *Trichoderma harzianum* sobre piel wet blue después de 90 días de incubación. Columna de izquierda a derecha: Control, 0.12%, 0.16%, 0.20%, 0.24% IPBC

4.2.2 Curtición y engrase de piel vegetal. Control de crecimiento de hongos

La Tabla 10 muestra los resultados de porcentaje de crecimiento de moho sobre la piel y la zona de inhibición de las pieles curtidas con extractos vegetales y engrasadas. En este tipo de proceso se aplicaron cantidades menores de fungicida debido a que las pieles en este estado solamente necesitan resistir el ataque fúngico durante unas dos semanas, entre operaciones del proceso. El control se realizó durante 30 días.

Vegetal		<i>Aspergillus niger</i>		<i>Trichoderma harzianum</i>		<i>QF01- Penicillium spinulosum</i>	
DIMPTS		CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)
C0	Control	84.3	0	100	0	100	0
C1	0.02	0.3	3	12.3	0	0.7	0
C2	0.04	0	7	1.7	4.3	0.2	1
C3	0.06	0	7.3	0	9.3	0.7	5.7
C4	0.08	0	21.3	0	7	0	12.3
IPBC		CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)	CS (%)	ZI (mm)
C0	Control	78.3	0	100	0	100	0
C1	0.02	0	10	40	0	0	4
C2	0.04	0	14.7	11	0	0	7.7
C3	0.06	0	21	6	0	0	11
C4	0.08	0	26	1.2	0	0	13.7

Tabla 10. Resultados de Crecimiento en Superficie (CS) y de Zona de Inhibición (ZI) observados en las diferentes muestras de piel vegetal, transcurridos 30 días de control

A pesar de que las cantidades aplicadas eran menores, un 0.06% de DIMPTS es capaz de evitar el ataque del *Trichoderma harzianum*, y para el *Aspergillus niger*, con un 0.04% es suficiente y para el *Penicillium spinulosum* es necesario aumentar la oferta a 0,08 %. Para este tipo de pieles, un 0.02% de IPBC fue suficiente para evitar la contaminación del *Aspergillus niger* y del *Penicillium spinulosum*, pero para evitar el ataque del *Trichoderma harzianum* durante un mes, se necesita una cantidad mayor que un 0.08%.

La Imagen 3 muestra el efecto que ejercen las distintas concentraciones de IPBC aplicadas sobre piel vegetal, frente al ataque de la cepa *Penicillium spinulosum* (QF01), transcurridos 30 días de la siembra.

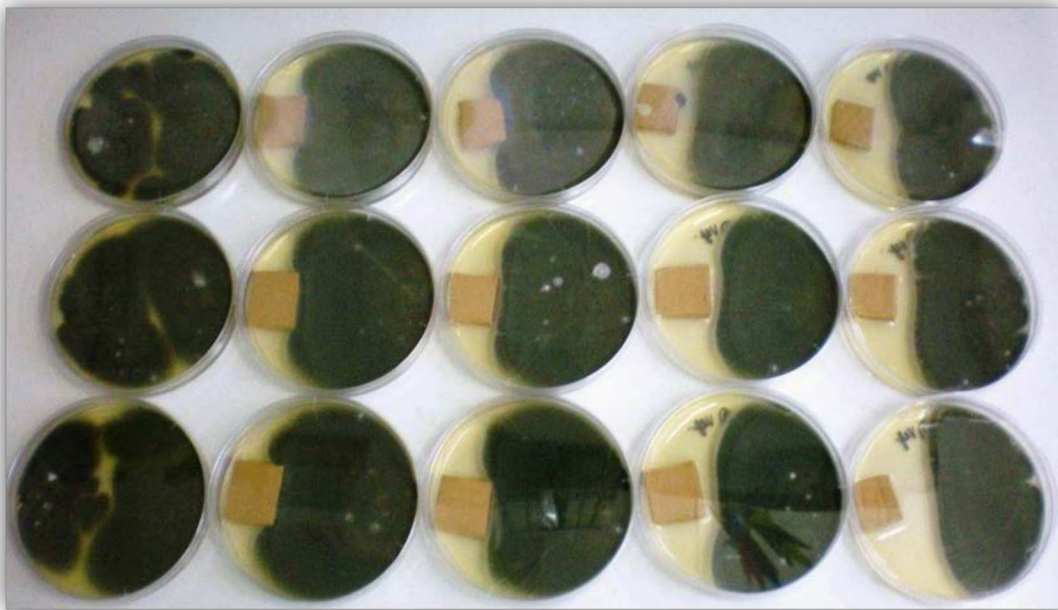


Imagen 3. Control de crecimiento del *QF01* (*Penicillium spinulosum*) sobre piel curtida con extractos vegetales después de 30 días de incubación. Columna de izquierda a derecha: Control, 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08% IPBC

La protección de los cueros al vegetal es más difícil debido a los nutrientes que confieren los agentes curtientes vegetales a los microorganismos. Los agentes curtientes vegetales (polifenoles combinados con hidratos de carbono) ofrecen a los hongos un nutriente directo en forma de azúcares simples.

4.3 Determinación de fungicida en la piel

4.3.1 Contenido total de fungicida

Cuanto mayor es el porcentaje de fungicida añadido al proceso, mayor cantidad de fungicida se determina en la piel, a pesar de que no se cumple la proporción entre las muestras. Posiblemente se debe a que la piel es una matriz irregular y no se deposita el fungicida uniformemente. El Gráfico 1 muestra la relación de cantidades de fungicida en la piel expresadas en mg sobre kg de piel húmeda.

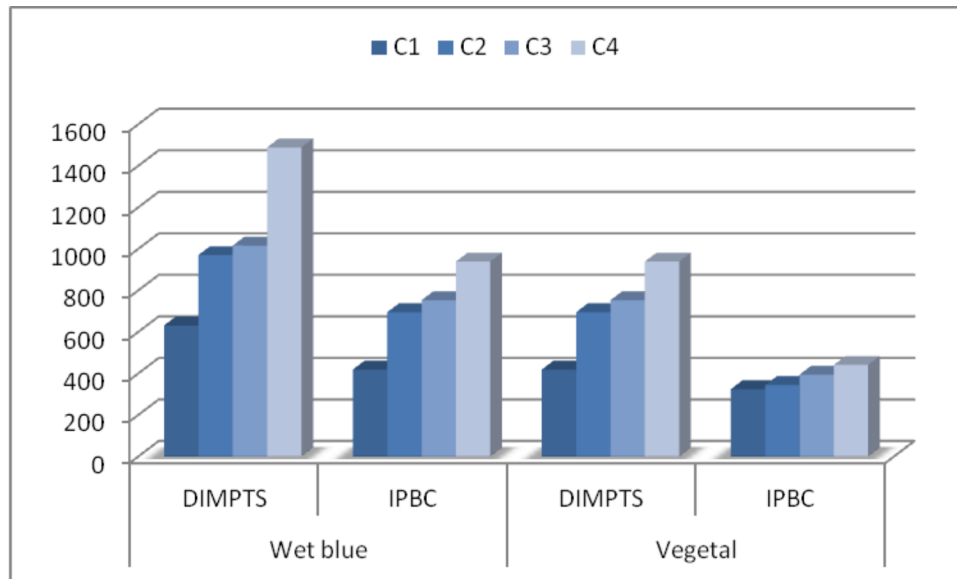


Gráfico 1. Cantidad total de fungicida determinada en la piel

4.3.2 Contenido estratigráfico de fungicida

Según Hauber (14), la distribución del fungicida en las capas de una piel bovina es distinta, y se puede generalizar resumiendo que la capa flor contiene un 60-70%, la capa intermedia un 10-20% y la capa carne puede absorber un 25-30% de fungicida. Siguiendo estas pautas, y con los resultados obtenidos (Tabla 11, Gráfico 2) se observa que en el caso de la curtición al cromo prácticamente todos los productos analizados cumplen con estos criterios. La distribución de piel vegetal muestra una cantidad de fungicida en las capas externas muy similar, dejando menos productos en el interior.

	TCMTB		DIMPTS		IPBC	
	Wet Blue	Vegetal	Wet Blue	Vegetal	Wet Blue	Vegetal
Flor	74.0	49.3	70.5	36.7	69.7	37.4
Intermedia	10.9	10.4	4.8	15.2	11.4	22.8
Carne	15.1	40.3	24.7	48.1	18.9	39.8

Tabla 11. Porcentaje de fungicida (%) contenido en cada capa de piel en los dos tipos de curticiones

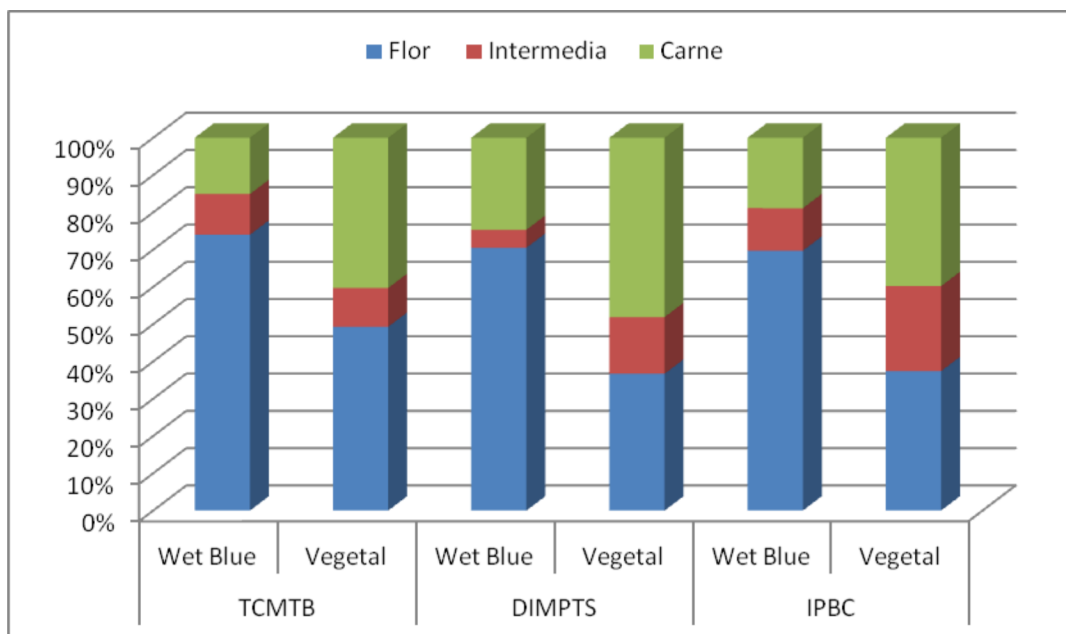


Gráfico 2. Distribución estratigráfica de fungicidas en la piel

Se observa que la distribución estratigráfica es distinta en los dos tipos de curtidoreo. Así como las pieles wet blue confirman las afirmaciones de Hauber, que la mayor concentración de fungicida (entre un 60 y un 70%) se deposita en la capa flor, en el caso de la piel curtida con extractos vegetales, la capa flor y la capa carne poseen una cantidad de fungicida similar (35-50%), dejando la menor concentración en el interior (10-20%).

4.4 Determinación de la toxicidad de los baños residuales de curtidoreo

Se determinó la toxicidad de un baño sin fungicidas añadidos (control o de referencia), y se comparó con la toxicidad producida por los baños de curtidoreo en la que se habían añadido los productos estudiados: TCMTB, DIMPTS e IPBC. Este proceso se realizó para los dos tipos de procesos descritos: curtidoreo wet blue y engrase de piel vegetal.

En el Gráfico 3, la primera columna de cada caso corresponde a la toxicidad del baño sin fungicida añadido, y la cantidad (que nombramos como A y B) se ha tomado como referencia para evaluar el resto de baños.

La mayor toxicidad, y con diferencia, la presentó el TCMTB, una de las grandes problemáticas que siempre ha acompañado a esta molécula. Los dos fungicidas propuestos

como alternativos presentaron una toxicidad mucho más baja. Se destaca el resultado de la toxicidad producida por el baño con IPBC, debido a que tanto para la piel curtida al cromo como la piel curtida con extractos vegetales es igual a la que presentó el baño sin fungicida añadido.

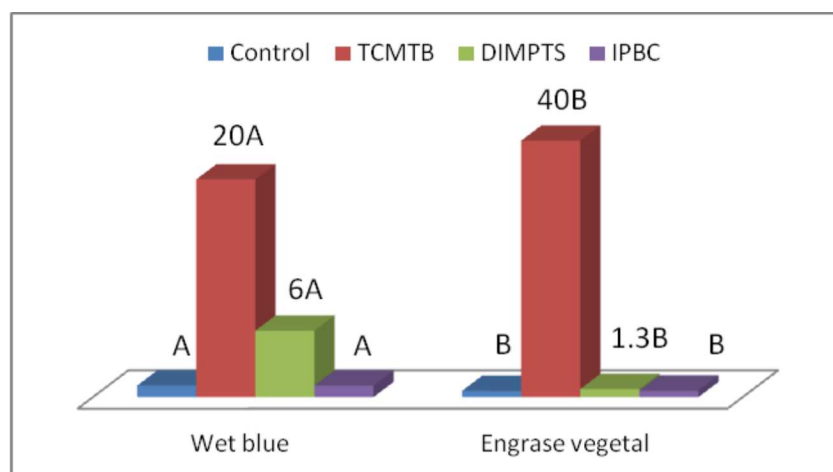


Gráfico 3. Comparación de la toxicidad de los baños residuales de las dos curticiones estudiadas. Todos ellos comparados frente a un baño de referencia, sin fungicida.

Sin embargo, el TCMTB es medioambientalmente inestable. Es estable al pH ácido de los baños residuales, pero se degrada progresivamente a pH 7. La tasa de la hidrólisis aumenta rápidamente a valores de pH más altos. Esto significa que en las condiciones de la planta de tratamiento de aguas residuales, la toxicidad del TCMTB será mucho menos importante que en las condiciones de los baños residuales. (15)

5 CONCLUSIONES

Los fungicidas propuestos como alternativos diiodometil-p-tolilsulfona (DIMPTS) y del 3-iodo-2-propinil butilcarbamato (IPBC) demuestran una eficacia mayor que el 2-(tiocianometiltio)-1,3-benzotiazol (TCMTB), uno de los productos más usados en tenerías, tanto para las cepas adquiridas de la CECT como para las cepas aisladas de fábricas de curtidos. Estas cepas recogidas e identificadas revelan mayor resistencia a cualquier ataque fungicida ya que son resultantes de sobrevivir a procesos de fábrica, seguramente tratados con los fungicidas comunes, por lo tanto, con una resistencia adquirida a estos productos. Los

resultados aquí obtenidos, junto con las conclusiones extraídas de dos trabajos anteriores confirman la eficacia de estos dos fungicidas alternativos en el sector de curtición.

Un 0.2% es una cantidad usada normalmente para aplicar en curtición wet blue, pero se ha demostrado que porcentajes menores (entre 0.12 y 0.16%) de DIMPTS e IPBC evitarían el ataque de las tres cepas usadas para este estudio, comunes en fábrica. En el caso de la piel vegetal, para conservarla en perfecto estado durante cuatro semanas, sería necesario un porcentaje de entre 0.04 y 0.08 de DIMPTS. En cambio, con un 0.02% de IPBC bastaría para conferir una protección adecuada de la piel durante un mes para dos de las tres cepas consideradas (*Aspergillus niger* y *Penicillium spinulosum*). Es interesante destacar que los diferentes tipos de hongos requieren distintas cantidades de fungicida, tal y como se observa con los resultados de la CMI.

Al observar la distribución estratigráfica de los fungicidas en la piel, vemos que mientras que para la piel wet blue los dos compuestos fungicidas se distribuyen aproximadamente un 60-70 % en la capa de flor, un 10 – 20 % en la capa intermedia y un 25 – 30 % en la capa de carne, resultados que concuerdan con la bibliografía, en el caso de la piel vegetal, la distribución es distinta. Las dos capas externas contienen cantidades similares de fungicida (entre un 35-50%) y la capa intermedia solamente entre un 10 y un 20%. Es posible que una protección mayor en el exterior de la piel evite la entrada de las esporas en la misma.

La toxicidad determinada de los baños confirma una de las mayores problemáticas que presenta el 2-(tiocianometiltio)-1,3-benzotiazol (TCMTB) ya que fue éste el que presentó un valor más elevado y con diferencia (entre 20 y 40 veces la toxicidad presentada por el baño de referencia, sin fungicida añadido). El IPBC es el que produce menor toxicidad en las aguas residuales ya que coincide con la toxicidad determinada en baños en los que no se añadieron productos antifúngicos. La toxicidad del DIMPTS oscila entre 1.3 y 6 veces la toxicidad de referencia, mucho menor que el TCMTB. Todos ellos, valores determinados en el pH de final de proceso y que se reducen al aumentar el pH a 7.

6 AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia e Innovación la financiación económica obtenida a través del Proyecto CTQ2009-08347/PPQ.

7 BIBLIOGRAFÍA

- (1) Seguer J., Beltrán M., Rodríguez F.J., Ballester J., González M^a C., Fernández T., “Disminución de la toxicidad de las aguas residuales de un proceso de curtición en el que se ha utilizado TCMTB como protector de las pieles”; Proceedings 51 Congreso AQEIC, Tortosa (abril 2002); p.101-109
- (2) Hauber C.; “Fungicides”; Leather International. (16 august 2008) Consultat a: <http://www.leathermag.com>
- (3) Dalton D.L.; “New generation fungicide for the leather industry”; Leather; p.48-52 (ag-set. 2008)
- (4) Cuadros S., Manresa M., Font J., Bautista ME., Maldonado F., Marsal A.; “Alternative Fungicides: comparative study with conventional chemicals”, Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists (JSLTC) vol. 95-6 (nov-dec. 2011); p. 263-269
- (5) Cuadros S., Manresa M., Font J., Bautista ME., Puig R., Marsal A.; “Alternative Fungicides for the leather industry: application in different processes”, Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists (JSLTC) vol. 96-6 (nov-dec. 2012); p. 225-233
- (6) Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de febrero de 1998; Official Journal of the European Communities de 24 de abril de 1998; p. L123/1 – L123/63

- (7) Seguer J., Beltrán M^a T.; “Productos biocidas notificados en la Directiva 98/8/CE en el sector de curtición”; Proceedings del 52º Congreso AQEIC, Lorca (abril 2003); p. 37-47
- (8) Andrews J.M.; “Determination of minimum inhibitory concentrations”; Journal of Antimicrobial Chemotherapy 48, Suppl. S1 (2001); p.5-16
- (9) “Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)” of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID); 2000 Copyright by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI, 6, p. 509-515
- (10) Standard Test Method for Mould Growth Resistance of Wet Blue; ASTM D 4576-01
- (11) ISO/DIS 13365; Leather – Chemical Tests – “Determination of the preservative (TCMTB, CMK, OPP, OIT) content in leather”
- (12) UNE EN ISO 11348-3:2009; Calidad del agua. “Determinación del efecto inhibidor de muestras de agua sobre la luminiscencia de *Vidrio fischeri* (ensayo de bacterias luminiscentes). Parte 3; Método utilizando bacterias liofilizadas”
- (13) Onorati F. et al.; “Determinants and prognosis of myocardial camage after coronary artery bypass grafting”; The annals of thoracic surgery 2005, 79; 837-845
- (14) Hauber, C.; “Microbicide applications in the leather industry”, En: Paulus, W. (Ed), Directory of microbicides for the protection of materials, Springer, Berlin, p. 317-324
- (15) H.W. Hanssen, N.D. Henderson & J.E.H Ward; “A review of the environmental impact and toxic effects of TCMTB”; Environmental Protection

Division; B.C. Environment; 810 Blanshard Street, Victoria, British Columbia, V8V
1X5

ALTERNATIVE FUNGICIDES FOR THE LEATHER INDUSTRY: APPLICATION IN WET BLUE AND VEGETAL LEATHER

Sara Cuadros¹, M^a Àngels Manresa³, Joaquim Font², M^a Elena Bautista¹, Rita Puig², Agustí Marsal¹

¹ Department of Chemical Technology and surfactants, IQAC, CSIC, Barcelona - agusti.marsal@iqac.csic.es

² Igualada Leather Technology School, EEI-UPC, A3 CHAIR IN LEATHER INNOVATION (Barcelona)

³ Faculty of Pharmacy, Department of Microbiology UB, Barcelona



INTRODUCTION

Optimum conditions for the growth of several fungi in tanneries:
- a pH range (3-6)
- a temperature of 25°C
- Ambient humidity between 12-15%

Legislación medio-ambiental cada vez más estricta

The need of research of alternatives fungicides

AIM OF THE WORK

This work is focused on the search of alternatives to the fungicides conventionally used in the tanning industry, Alternatives with a high efficiency in front of a wide range of fungi and less toxic, more environmentally friendly and cost effective.

The main objective is to evaluate the fungicidal capacity of the selected compounds (registered in the 98/8/EC Directive) against different strains of fungi. The fungicidal capacity of the selected compounds will be compared with TCMTB (commonly used).

Different amount of fungicide will be applied in lab drums, in two different processes: wet blue tanning and vegetal fatliquoring.

Un control microbiológico, la determinación total y estratigráfica de fungicida y la toxicidad de las aguas residuales forman completaran los estudios.

MATERIAL	
SELECTED FUNGICIDE	CHEMICAL STRUCTURE
2-(thiocyanomethyl)-1,3-benzothiazole TCMTB (~ 30% active ingredient)	
Diiodomethyl-p-tolylsulfone DIMPTS (~ 40% active ingredient)	
3-iodo-2-propynyl-N-butylcarbamate IPBC (~ 30% active ingredient)	

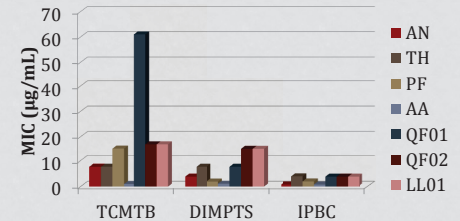
The fungicidal capacity of the selected fungicides was carried out against strains of the following fungi :

AN TH PF AA LL01 QF01 QF02

Aspergillus niger (CECT2088), *Trichoderma harzianum* (CECT2423), *Penicillium funiculosum* (CECT2914), *Alternaria alternata* (CECT2662), *Penicillium spinulosum*, (QF01) *Penicillium Decumbens* (QF02), *Trichoderma Harzianum* (LL01)

MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC)

Is defined as the lowest concentration (expressed in µg/mL) of an antimicrobial that will inhibit the visible growth of a microorganism after an incubation period.



DIFFERENT AMOUNT OF FUNGICIDE APPLIED IN TWO DIFFERENT PROCESSES

Se partió de piel vacuna que se dividió en 9 partes distintas para cada uno de los procesos estudiados. Se realizó una curtiembre wet blue y un engrase de piel vegetal, aplicando distintas cantidades de fungicida:

Fungicide applied		WET BLUE	VEGETAL
C1 - DIMPTS	C1 - IPBC	0.12%	0.02%
C2 - DIMPTS	C2 - IPBC	0.16%	0.04%
C3 - DIMPTS	C3 - IPBC	0.20%	0.06%
C4 - DIMPTS	C4 - IPBC	0.24%	0.08%
CONTROL		0	0

Control of fungal growth on leather → Standard ASTM D4576-01. Estudio por triplicado sobre placas estériles con medio de cultivo potato destrose agar.

Wet Blue - Results of the fungicidal capacity of different offers of IPBC after 90 days of testing (TH)	Vegetal - Results of the fungicidal capacity of different offers of DIMPTS after 30 days of testing (AN)	WET BLUE - Between 0.12 and 0.16% de DIMPTS e IPBC evitarían el ataque de las tres cepas usadas. VEGETAL - Bastaría un porcentaje de entre 0.04 y 0.08 de DIMPTS para proteger las pieles frente a las cepas estudiadas. Y un 0.02% de IPBC protegería la piel durante un mes frente a dos de las tres cepas consideradas (AN y QF01)
Control 0.12% 0.16% 0.20% 0.24%	Control 0.02% 0.04% 0.06% 0.08%	

CONCLUSIONS

Los fungicidas DIMPTS y IPBC demuestran mayor eficacia que el TCMTB frente a las cepas seleccionadas.

Tanto para curtiembre wet blue como para engrase vegetal, las cantidades aplicadas son suficientes para proteger las pieles de las cepas utilizadas en este estudio.

Es importante destacar que los diferentes tipos de hongos requieren distintas cantidades de fungicida, tal y como se observa con los resultados de la CMI.

La distribución estratigráfica es distinta para piel wet blue y para piel vegetal.

El TCMTB es el que presentó mayor toxicidad en los baños, entre 20 y 40 veces la toxicidad presentada por el baño de referencia, baño sin fungicida añadido. La toxicidad del IPBC coincide con la del control. Todos ellos, valores determinados en el pH de final de proceso y que se reducen al aumentar el pH a 7.

Una mayor capacidad antifúngica del DIMPTS y del IPBC en los diferentes procesos estudiados aseguran fiabilidad para utilizarlos en una amplia variedad de operaciones.

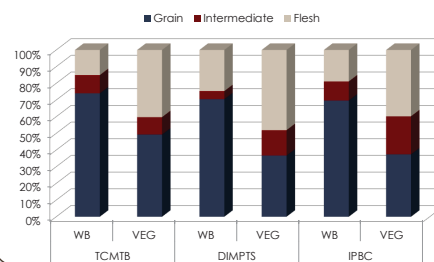
REFERENCES

- Cuadros S., Manresa M., Marsal A. et al.; "Alternative Fungicides: comparative study with conventional chemicals"; JSLIC, vol. 95-6 (nov-dec. 2011); p. 263-269
- Cuadros S., Manresa M., Marsal A., et al.; "Alternative Fungicides for the leather industry: application in different processes"; JSLIC vol. 96-6 (nov-dec. 2012); p. 225-233

Se realizó una formulación tradicional de curtiembre wet blue (0.20% fungicida) y engrase de piel vegetal (0.04% fungicida). De las pieles resultantes se determinó el contenido estratigráfico de fungicida. Los fungicidas utilizados fueron TCMTB, DIMPTS e IPBC.

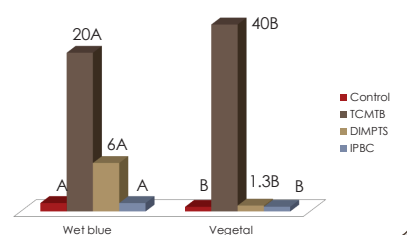
STRATIGRAPHIC DISTRIBUTION OF FUNGICIDES

Standard ISO/DIS 13365



TOXICITY OF WASTEWATERS

Standard UNE EN ISO 11348-3:2009 (MICROTOX)



ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation through the CTQ2009-08347 Project.