

# Antiossidanti biocompatibili come antimuffa nella conservazione delle pelli

Graziella Battilana<sup>1</sup> e Laura Iannone<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ITIS 'G. Galilei', Arzignano, Vicenza.

<sup>2</sup> Socio AICC.

## INTRODUZIONE

I bagni di concia, se non agitati, si ricoprono di muffe di colore bianco, grigio e poi verde. Le muffe principali sono il *Penicillium glaucum*, e il *Aspergillus niger*. Si nutrono per lo più di zuccheri, o in generale di materia ricca in carbonio, azoto, ossigeno, idrogeno e minerali; nella concia al vegetale impoveriscono anche i tannini. Possono essere molto dannose perché il loro sviluppo non è sempre limitato ai bagni di concia ma alcune volte passano agli essiccatori ed alla rifinizione causando macchie sui cuoi. I funghi possono provocare una alterazione dello strato superiore del fiore e anche deteriorare la struttura fibrosa del collagene, sotto il fiore.

Per limitare i danni sulla pelle durante la concia si usano prodotti chimici molto dannosi per l'operatore che si trova a maneggiare le sostanze pure, per il consumatore che può assorbirle dal prodotto (specie attraverso le scarpe e nei bambini) e per l'ambiente verso il quale non sono ancora state studiate tutte le possibili ricadute.

Attualmente gli antimuffa utilizzati per la conservazione delle pelli sono clorofenoli e TCMBT (Thiocianomethylthio benzotriazol). Questi composti sono biocidi ad elevata tossicità e la loro presenza nelle acque reflue di conceria potrebbe rappresentare un pericolo per la funzionalità degli impianti di trattamento biologico dei depuratori.

La legge ha fissato limiti e restrizioni per limitare i possibili danni, in un contesto di consapevolezza ambientale e rispetto verso l'operatore ed il consumatore.

Ed è grazie a questa mentalità ecologica e alla presa di coscienza dei danni che sostanze così tossiche producono, che è nata l'esigenza di sostituire questi biocidi con composti efficaci a bassa concentrazione, di modesta tossicità, biocompatibili e di costi accettabili.

Gli antiossidanti sono una classe di sostanze che potrebbe presentare le caratteristiche desiderate.

Si è voluto verificare se questi antiossidanti possano svolgere la loro funzione a contatto con muffe provenienti da peli: perciò sono stati condotti esperimenti in laboratorio per determinare, in alcuni casi, la loro efficacia, la minima concentrazione inibente nei confronti di miceti provenienti da peli e il loro effetto sui fanghi attivi.

È stata inoltre testata la capacità di certi antiossidanti per oli alimentari (BHT di (t-butil)idrossitoluene, BHA (t-butil idrossianisolo), TBHQ (t-butil idrochinone) e PG (galatto di propile)) di inibire la formazione delle muffe su peli wet-blue in condizioni di temperatura e umidità controllate durante un normale processo lavorativo.

## OBIETTIVI

Lo scopo della ricerca è quello di verificare la capacità degli antiossidanti per oli alimentari (food grade) di inibire lo sviluppo delle muffe, ipotizzando il loro meccanismo di azione e determinare la loro specificità nei riguardi di vari ceppi.

In questo modo contribuire a uno sviluppo sostenibile sostituendo gli antimuffa classici dannosi utilizzati per la conservazione delle pelli nell'industria conciaria, attività chiave nel nostro territorio.

## MATERIALI E METODI

L'attività antimuffa dei composti è stata studiata sia su supporti biologici standard in laboratorio (piastre) sia su pelli bovine conciate allo stato di Wet-blue durante un normale processo lavorativo di concia. I prodotti utilizzati, acquistati dalla Sigma-Aldrich sono stati:

- BHT [di (t-butil)idrossitoluene];
- BHA [t-butil idrossianisolo];
- TBHQ [t-butil idrochinone];
- PG [galatto di propile].

### Studio Chimico Conciario

#### Concia delle pelli.

Due mezzine di vitello salate secche sono state prelevate in bottale 200% H<sub>2</sub>O a 20°C per 10 min., il bagno scaricato. Poi rinverdite per 48 ore: 200% H<sub>2</sub>O a 20°C; 0,2% tensioattivo anionico; 0,3% antibatterico, botti 1 ora. Quindi in automatico 10 min. rotazione e 50min. fermo. Il bagno scaricato.

Dopo si è effettuato il calcinaio per l'eliminazione del pelo: 100 % H<sub>2</sub>O a 20°C; 1,5% Ca(OH)<sub>2</sub> e 1% Na<sub>2</sub>S, rot. 1 ora. Si è aggiunto 70% H<sub>2</sub>O; 1,5% Ca(OH)<sub>2</sub>; 0,8% Na<sub>2</sub>S e 0,5% sgrassante, rot. 20 min; in automatico per 24 ore; 5 min. rot e 55 min. sosta. Dopo si sono fatti due lavaggi con 200% di H<sub>2</sub>O. Le pelli sono state scarnate e spaccate all'esterno.

Si è proseguito con il fiore. Pesandoli si è ottenuto il peso trippa. Sono state lavate con acqua fino a 35°C. Quindi si è effettuata la decalcinazione: 100% H<sub>2</sub>O a 38°C; 1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, rot. 10 min; 1,2% decalcinante in 3 rate, rot. 40 min., fermo, rot. 60 min. Si è portato il pH del bagno 7,5-8,5; si è controllato in sezione incolore alla fenofaleina. Poi si è fatta la macerazione con 0,5% di Oronon R, rot. 40 min. Il bagno scaricato. Si è lavato con H<sub>2</sub>O a 20°C e si è scolato.

Il pickel si è effettuato con il 70 % H<sub>2</sub>O a 20°C; si è aggiunto 7% NaCl per avere una densità salina da 7-8 ° Be°; 0,5% HCOOH dil 1:10, rot. 10 min.; 1,2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dil 1:20 a piccole rate, rot. 3 ore. Le pelli sono rimaste durante la notte nel bagno; pH finale = 2,8.

Metà bagno è stato scolato e si è aggiunto 7% di Cromitan B; rot. 1 ora (sez. verde); 0,5% NaCOOH a rate, rot. 1 ora; 0,4% autossificante, rot. 8 ore, T=32°C; dopo T= 40°C 1 ora; scaricato il bagno.

Le pelli sono state messe a cavalletto. Così ottenuto il wet-blue si è proseguito con la pressatura, la rasatura e la pesatura.

#### Ricerca del solvente adatto per gli antimuffa

Sono state fatte prove di solubilità degli antimuffa con diversi solventi e miscele tra di loro per cercare il modo più adatto di aggiungerli nella fase dell'ingrasso: H<sub>2</sub>O; C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH; C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>(OH)<sub>2</sub>; (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO; CH<sub>2</sub>ClCO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>; Cl<sub>2</sub>CH. I più adatti sono stati il secondo e il terzo.

#### Aggiunta degli antimuffa

Ogni antimuffa è stato sciolto e aggiunto nei bottali d'ingrasso (Coripol NU e Chromopol SG, TFL) nelle concentrazioni di 0,02%, 0,04%, 0,06%, 0,08%, 0,1%.

Sono stati usati separatamente i due solventi scelti. Altri 3 ingrassi senza antimuffe sono stati preparati: uno con ogni solvente e uno senza solvente, come bianchi.

Di seguito sono stati tagliati campioni di ogni pelle, messi in sacchetti di plastica chiusi e conservati in camera climatica a T = 30°C e U = 60%.

#### Prove sulle pelli

Sono anche stati tagliati cerchietti di pelle con le diverse concentrazioni di antimuffa e sono state seminate con muffe provenienti da altri peli.

Queste sono state sviluppate in terreno Plate Count Agar. Usando piastre Petri si ha seminato per striscio con cottonfioc sterile. Le pelli sono state seminate in vicinanza a un becco Bunsen.

Messi in camera climatica e osservati dopo 15, 30 e 50 giorni.

## Bibliografia

- 1) Lubert Stayer, *Biochimica, Zanichelli* ed 1996.
- 2) Cappelli e Vanucci, *Chimica degli alimenti*, Zanichelli ed 2007.
- 3) Baird e Cann, *Chimica Ambientale*, Zanichelli ed 2006.
- 4) Hart e Craine, *Chimica Organica*, Zanichelli ed 2003.
- 5) Giorgio Martignone, *Manuale di Pratica Conciaria*, Edimta 1997.
- 6) Umberto Sammarco, *Tecnologia Conciaria*, Edimta 2007.
- 7) Hermann Loewe, *Tecnologia Chimica della lavorazione del cuoio*, BASF.
- 8) Environmental risk limits for antifouling substances, *Aquat Toxicol*, 2004 mar10; 66 (4): 427-44.
- 9) RL Rusting, *Scientific American*, 1992, dic, 131-141.
- 10) Giuliano Ricciotti, *Chimica Organica*, Italo Bovolenta ed 2002.
- 11) M.Stefani: "Biochimica con elementi di biologia molecolare e scienze dell'alimentazione" Bologna-Zanichelli ed. 2006.
- 12) "Microbiologia della pelle", A.Vleeshouwers, Buckmann Laboratories
- 13) Lansing M. et al: *Microbiologia*, Bologna, Zanichelli ed. 1995.
- 14) Seeley H.W. et al: *laboratorio di microbiologia*, Bologna Zanichelli ed. 1995.
- 15) Fontani N. et al: *Atlante fotografico: guida al riconoscimento delle principali muffe presenti nelle acque da destinarsi al consumo umano*, Bologna AGAC (agenzia gas acqua consorziale) Reggio Emilia 1998.
- 16) Spigoni G. et al: *I principali microorganismi filamentosi del fango attivo*, Bologna AGAC (Agenzia Gas Acqua Consorziale) Reggio Emilia 1998.
- 17) Villavecchia V. et al: *Nuovo dizionario di merceologia e chimica applicata*, Hoepli ed. 1982.
- 18) Fiorini M.G.: *Microbiologia principi e tecniche*, Bologna Zanichelli ed. 1999.
- 19) Bononi M.: *L'approccio analitico come presupposto essenziale allo sviluppo di impiego di coloranti ed antiossidanti*, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Milano.
- 20) Madoni P., *Applicazione dell' indice biotico del fango (S.B.I.) nel processo di depurazione a fanghi attivi*, Università degli Studi di Parma, Dipartimento di Scienze Ambientali, 2004.
- 21) D. L. 25/2/2000, n. 174 Attuazione della direttiva 98/8/CE in materia di immissione sul mercato di biocidi, G. U., 149, 28/6/2000, n. 101.

## Conclusioni

### Ambito Chimico

È stato riscontrato che il TBHQ risulta migliore antimuffa delle altre tre sostanze testate ed è effettivo a concentrazione 0,04%. Il BHT e il BHA hanno un comportamento simile e il PG offre le prestazioni più scarse. Tutti i quattro sono composti fenolici diversamente sostituiti. Si ossidano con facilità distruggendo i radicali perossidici. Grazie a questa loro caratteristica vengono spesso aggiunte ad altre molecole perché le "proteggono" ossidandosi loro per prime. Tra le possibili spiegazioni della capacità degli antiossidanti di evitare o ritardare lo sviluppo delle muffe sulle pelli si può attribuire l'attività antimuffa al loro intervento: a) nella catena respiratoria, durante l'ossidazione di un idrochinone a chinone; b) nella β-ossidazione degli acidi grassi che svolgono un ruolo importante come riserva di energia.

## Studio Biologico

### Determinazione dell'AUR (Ammonia Uptake Rate)

Il metodo consente di determinare la velocità di ossidazione e trasformazione dell'azoto ammoniacale in azoto nitroso ed azoto nitrico in condizioni prefissate. A tale scopo viene determinata la concentrazione di azoto nitroso ed azoto nitrico all'inizio ed alla fine della prova.

L'AUR viene determinato mediante la seguente relazione:

$$AUR (mg N_{SSV} \cdot h^{-1}) = [(C_{nitroso,1} + C_{nitroso,2}) - (C_{nitroso,0} + C_{nitroso,3})] / (SST \cdot SSV/100)$$

C<sub>nitroso,0</sub> = concentrazione (in mg/l N) di azoto nitroso alla fine della prova;

C<sub>nitroso,1</sub> = concentrazione (in mg/l N) di azoto nitroso alla fine della prova;

C<sub>nitroso,2</sub> = concentrazione (in mg/l N) di azoto nitroso al tempo zero;

C<sub>nitroso,3</sub> = concentrazione (in mg/l N) di azoto nitrico al tempo zero;

t = durata (in ore) della prova;

SST = solidi sospesi totali (g/l) del campione relativo all'uscita denitrificatore;

SSV = solidi sospesi volatili (%) → viene utilizzato per il calcolo il valore determinato per il campione relativo all'uscita ossidazione biologica che è però uguale a quello del campione uscita denitrificatore. Determinare periodicamente i solidi sospesi volatili sul campione relativo all'uscita ossidazione biologica.

### Isolamento ed identificazione di muffe

Sono state isolate muffe provenienti da pelli con il metodo delle piastre contact (Sabouraud Agar); successivamente studiando le loro caratteristiche fenotipiche (aspetto delle colonie in piastra e caratteristiche delle ife e degli sporangi al microscopio) si è giunti all'identificazione del genere o della specie.

### Valutazione della MIC del PG e del BHA

Gli antiossidanti utilizzati sono stati due: il butilidrossianisolo (BHA E320) e il galatto di propile (PG E310). Dopo aver valutato che i diluenti utilizzati per sciogliere le due sostanze non abbiano effetti selettivi alle dosi utilizzate, sono stati seminate muffe sia con il metodo delle piastre contact sia con quello dello spatolamento superficiale su piastre contenenti concentrazioni crescenti di BHA e PG. È stata poi monitorata nel tempo l'eventuale crescita e l'aspetto delle muffe al fine di determinare la MIC (Minima Concentrazione Inibente) del PG e del BHA.

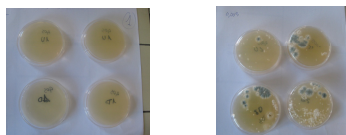
Valutazione sinergia fra il PG e il BHA nella loro attività antimuffa  
Utilizzando la semina di muffe su contact e per spatolamento superficiale su piastre contenenti concentrazioni diverse di miscele di BHA e PG e successivamente monitorando la crescita e l'aspetto delle colonie, è stata valutata una possibile sinergia, nella loro capacità antimuffa, fra le due sostanze.

### Valutazione dell'effetto del BHA e del galatto di propile sui fanghi attivi.

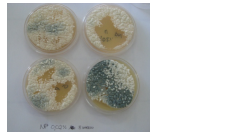
Campione	Dosaggio antiossidante (mg/l)	AUR mg N/g h
Bianco	0	1,24
PG1	0,50	0
PG2	0,05	1,19
BHA1	1	0,04
BHA2	0,1	0,55

### Valutazione visiva della crescita micetica a concentrazioni crescenti di BHA per la determinazione della MIC

0,025% BHA su pelle con nessuna crescita micetica.



0,05% di BHA con ridotta crescita microbica e controllo (sotto).

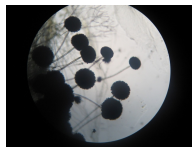


### Identificazione muffe

Dalle muffe selezionate si è spesso riscontrata la presenza di *Aspergillus niger*

Piastra di *Aspergillus niger*

Aschi e micelio di *Aspergillus niger* al microscopio



## Risultati

### Campioni di pelle dopo 15 giorni

Antimuffa conc.	BHA	TBHQ	PG	BHT
0,1%	-	-	-	-
0,08%	-	-	±	-
0,06%	-	-	+	-
0,04%	+	-	+	±
0,02%	+	+	+	±
0% in etanolo	+			
0% in glicole etilenico	+			
0% senza solvente	+			

### Campioni di pelle dopo 30 giorni

Antimuffa conc.	BHA	TBHQ	PG	BHT
0,1%	-	-	-	-
0,08%	-	-	±	-
0,06%	-	-	+	+
0,04%	+	-	++	++
0,02%	+++	++	++	++++
0% in etanolo	+			
0% in glicole etilenico	+			
0% senza solvente	+			

### Campioni di pelle dopo 50 giorni

Antimuffa conc.	BHA	TBHQ	PG	BHT
0,1%	±	-	+	-
0,08%	±	-	+	-
0,06%	±	-	++	++
0,04%	+	-	+++	+++
0,02%	+++	++	++	++++
0% in etanolo	+			
0% in glicole etilenico	+			
0% senza solvente	+++			

### Campioni di pelle wet-blue con diverse concentrazioni degli antiossidanti



## RINGRAZIAMENTI

Ringraziamo la collaborazione dei ragazzi delle classi quinte del ITIS 'G. Galilei': Valentina Dalla Valle, Giulio Dalla Verde, Davide Frasca, Manuel Giurilo e Nicola Serafini; agli assistenti tecnici Sig.ra Marina e Sig. Paolo; alla Prof.ssa De Noni; alla Dirigente scolastica Prof.ssa Eleonora Schiavo. Al ing. Refosco e al Prof. Alberto Ballardini.