

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; ammecc@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, Universidad de Barcelona (UB), Barcelona, Spain.

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.

Keywords: fungicidas alternativos, cepas de hongos, wet blue, piel vegetal toxicidad.

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 piqué, 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)

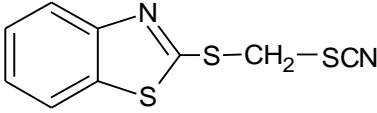
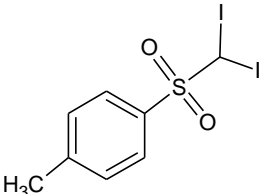
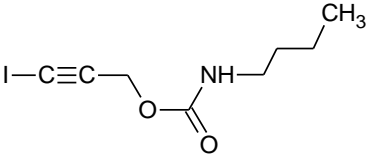
	FUNGICIDA	ESTRUCTURA QUÍMICA
Fungicida de uso común en el sector	2-(tiocianometilto)-1,3-benzotiazol TCMTB (~ 30% principio activo)	
Fungicidas propuestos como alternativos	Diiodometil-p-tolilsulfona DIMPTS (~ 40% principio activo)	
	3-iodo-2-propinil-N-butilcarbamato IPBC (~ 30% principio activo)	

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 brasiliensis*, *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.

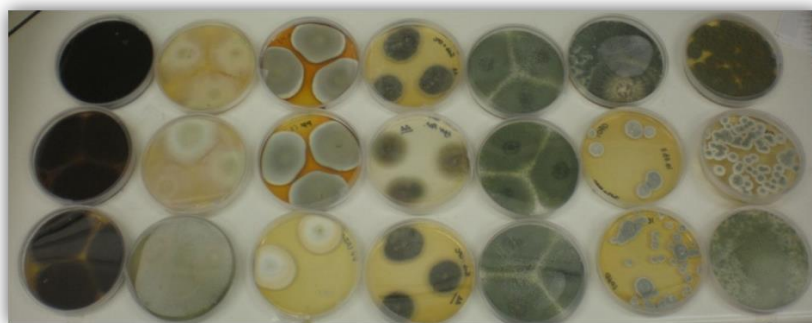


Imagen 1. Aspecto de los hongos seleccionados sobre placa (triplicado). De izquierda a derecha: *Aspergillus brasiliensis*, *Trichoderma harzianum*, *Penicillium funiculosum*, *Alternaria alternata*, *Trichoderma harzianum* - LL01, *Penicillium spinulosum* - QF01, *Penicillium decumbens* - QF02

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 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 $10240\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta $0.078\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 (X/2) % fungicida	Rodar 60'
4% sal de cromo 33% basicidad	Rodar 60'
1% formiato de sodio	Rodar 3h
Noche en reposo	Rodar 3h
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	Rodar 2h
1 % Dispersante naftalen sulfónico	
0.18 % Bicarbonato de sodio	Rodar 2h
0.26 % Engrasante sulfatado	
30 % H ₂ O (a 35°C)	Rodar 12h
6 % Extracto de mimosa	
10 % Extracto de mimosa	Rodar 1h
0.5 % Dispersante naftalen sulfónico	
0.4 % Ácido oxálico	Rodar 20'
0.4 % EDTA disódico	
50 % H ₂ O	
Escurrir baño – vaciar	
200 % H ₂ O	
Escurrir baño – vaciar	
Descargar piel	
Escurrir piel	

Tabla 5. Fórmula del proceso de curtición vegetal

Porcentaje sobre peso escurrido	
70 % H ₂ O (55°C)	Rodar 60'
4,30 % Engrase sulfatado	
1 % Engrase sulfitado	Rodar 25'
X % Fungicida	
0,45 % EDTA disódico	Rodar 1'
0,17% Ácido oxálico	
Escurrir – vaciar	
160% H ₂ O	
Escurrir – 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 brasiliensis*, 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 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. 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.

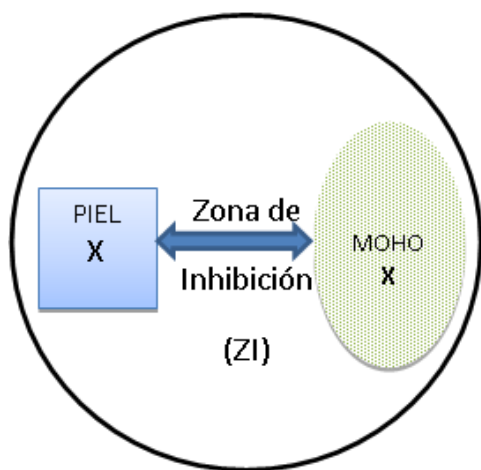


Figura 1. Ejemplo con las localizaciones de la inoculación (X).

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 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 brasiliensis</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 brasiliensis</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 brasiliensis*, 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.

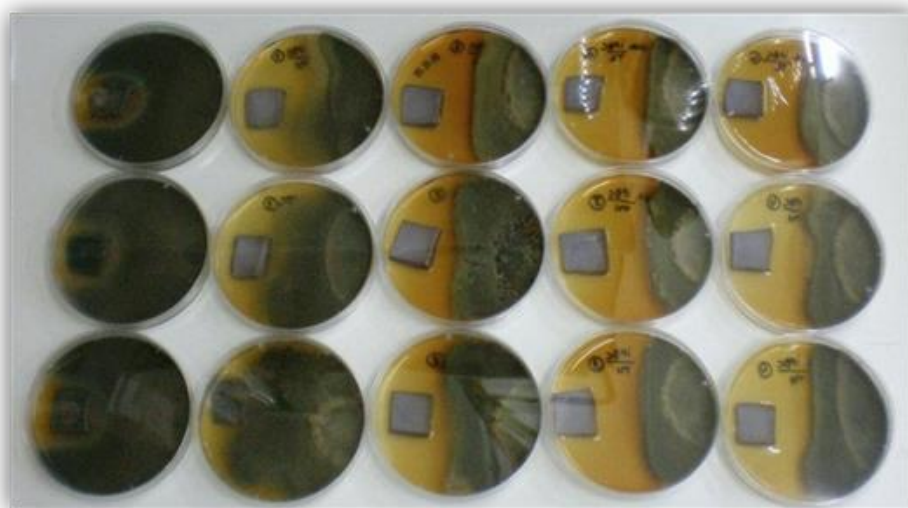


Imagen 2. Control de crecimiento del Trichoderma harzianum sobre piel wet blue después de 90 días de incubación. Columna de izquierda a derecha: Control, 0.12%, 0.16%, 0.20%, 0.24% IPBC

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 brasiliensis</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



TRUMPLER ESPAÑOLA, S.A.

C. Llobateras, 15. Centro Industrial Santiga. C.P. 08210 Barberà del Vallès (Barcelona-España) Tel: +34 937 479 355 / Fax: +34 937 188 006 / www.trumpler.de / www.trumpler.es

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 brasiliensis*, 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 brasiliensis* 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.

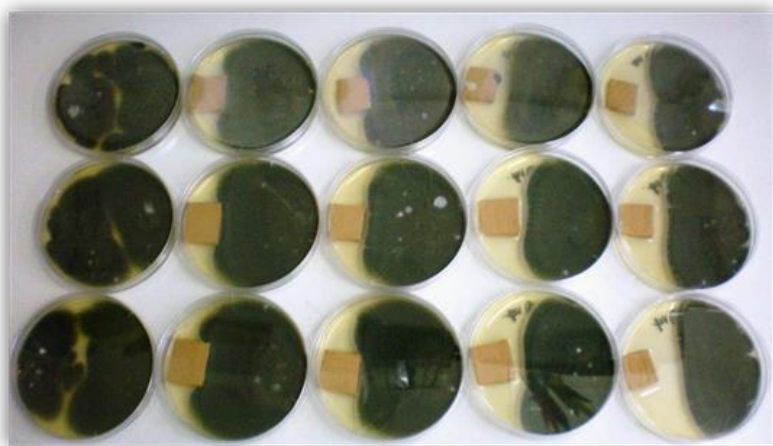


Imagen 3. Control de crecimiento del QF01 (Penicillium spinulosum) sobre piel curtida con extractos vegetales después de 30 días de incubación. Columna de izquierda a derecha: Control, 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08% IPBC

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.

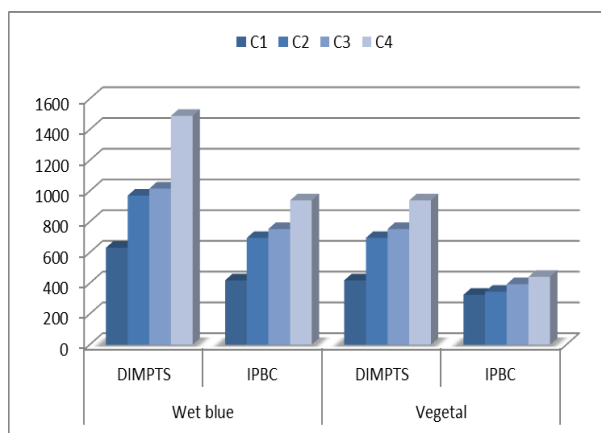


Gráfico 1. Cantidad total de fungicida determinada en la piel

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

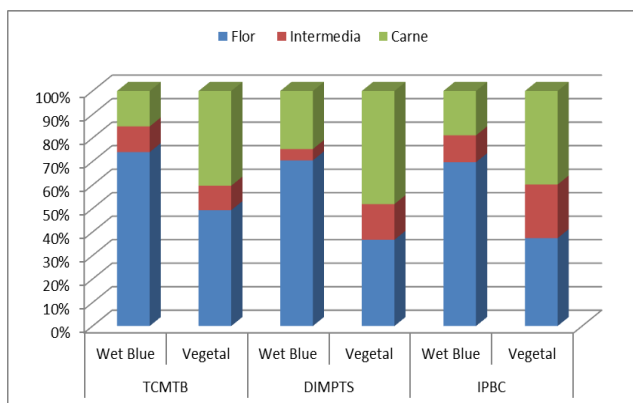


Gráfico 2. Distribución estratigráfica de fungicidas en la piel

Se observa que la distribución estratigráfica es distinta en los dos tipos de curtición. 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 curtición

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 curtición en la que se habían añadido los productos estudiados: TCMTB, DIMPTS e IPBC. Este proceso se realizó para los dos tipos de procesos descritos: curtición 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.

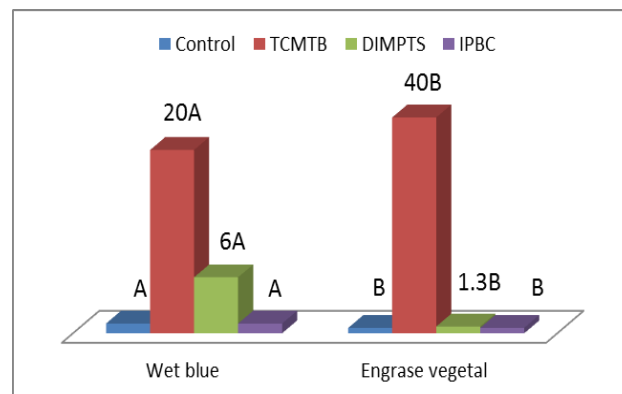


Gráfico 3. Comparación de la toxicidad de los baños residuales de las dos curticiones estudiadas. Todos ellos comparados frente a un baño de referencia, sin fungicida.

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-(tiocianometilitio)-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

At BASF, all aspects of safety and ecology are of utmost importance in our product and process development. Our sustainable solutions look into Carbon footprint, Water footprint, Resource footprint and Tox footprint. When customers feel safer and leathers are made more environmental-friendly, it's because at BASF, we create chemistry.



We Create Chemistry For A Sustainable Future

Come, visit us at ACLE, Shanghai
Hall E2, Booth E07
4 - 6 Sep, 2013

 **BASF**
The Chemical Company

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 brasiliensis* 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 damage 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