

UNIwersytet Ekonomiczny w Krakowie
Wydział Towaroznawstwa
Katedra Towaroznawstwa Przemysłowego

Elżbieta Bielak

**Wpływ wykończenia olejkami eterycznymi
skór podszevkowych
na ich właściwości higieniczne**

Streszczenie rozprawy doktorskiej
napisanej pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Marcinkowskiej
oraz promotora pomocniczego dr Justyny Syguły-Cholewińskiej

KRAKÓW 2016

Skóry podszewkowe wyścielające wnętrze obuwia pozostają w bliskim, a niejednokrotnie bezpośrednim kontakcie z ciałem użytkownika. W związku z tym, powinny być przyjazne dla skóry stóp osoby noszącej buty a przede wszystkim nie stwarzać jakiegokolwiek zagrożenia dla jej zdrowia. Specyficzny mikroklimat panujący wewnątrz użytkowanego obuwia może stanowić dogodne miejsce dla rozwoju mikroorganizmów patogennych dla człowieka, wywołujących infekcje i reinfekcje skórne. Problem ten jest szczególnie istotny w przypadku osób o zwiększonej potliwości stóp oraz podatności na grzybice skóry stóp i paznokci

Biorąc pod uwagę szkodliwość chemicznych substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym podjęto badania nad uszlachetnianiem bydlęcych skór podszewkowych substancjami pochodzenia naturalnego i jednocześnie wykazującymi działanie antyseptyczne, jakimi są olejki eteryczne. Celem pracy było określenie wpływu olejku cynamonowego, eukaliptusowego, lebiodkowego, manuka i tymiankowego zastosowanych do wykończenia skór podszewkowych na aktywność przeciwdrobnoustrojową skór, ze szczególnym uwzględnieniem możliwości oddziaływania tak wykończonych skór na mikroorganizmy zasiedlające obuwie, wywołujące infekcje oraz choroby skóry stóp. Wyniki badań mogą zostać wykorzystane w profilaktyce grzybiczy stóp, która stanowi uporczywą oraz wymagającą długotrwałego leczenia dolegliwość we współczesnym świecie.

W pracy wykorzystano zaawansowane metody badań, tj. chromatografię gazową ze spektrometrią mas i absorpcyjną spektrometrię atomową, które umożliwiły zdefiniowanie materiału doświadczalnego, jakim były olejki eteryczne. Pierwsza z wymienionych metod pozwoliła na określenie profili związków organicznych występujących w olejkach, jak i w fazie lotnej nad nimi, druga na określenie zawartości metali ciężkich w badanych olejkach.

W celu zbadania właściwości skór uszlachetnionych substancjami pochodzenia naturalnego wykorzystano metody badań mikrobiologicznych tj. metodę dyfuzji na płycie z agarem oraz metodę kontaktowego hamowania wzrostu bakterii, które pozwoliły na określenie efektu przeciwdrobnoustrojowego. Metody analizy sensorycznej umożliwiły zbadanie pożądalności zapachu skór natłuszczonych z dodatkiem olejków eterycznych oraz miękkości skór nienatłuszczonych „wet-blue”, natłuszczonych z dodatkiem i bez dodatku olejku lebiodkowego. Badając właściwości mechaniczne skór wykończonych przeciwdrobnoustrojowo wykorzystano metody pozwalające na określenie wytrzymałości na rozciąganie i wydłużenia oraz siły rozdzierającej. Metoda chromatografii gazowej ze spektrometrią mas pozwoliła na zbadanie fazy lotnej nad próbkami oraz analizę kinetyki emisji lotnych związków organicznych emitowanych z powierzchni skór natłuszczonych z dodatkiem olejku lebiodkowego w stężeniu 3% na masę skóry. Analizie statystycznej z wykorzystaniem

testów chi-kwadrat, Hartleya, Fishera-Snedecora, Kruskala-Wallisa poddano wyniki badań właściwości mechanicznych oraz pożądalności zapachu.

Na podstawie przeprowadzonych badań chromatograficznych stwierdzono, że w badanych olejkach oraz w fazie lotnej nad olejkami, były obecne związki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, co miało istotny wpływ na uzyskanie efektu przeciwdrobnoustrojowego skór wykończonych olejkami. Związkami tymi były m.in. eugenol (olejek cynamonowy), eukaliptol (olejek eukaliptusowy), karwakrol (olejek lebiodkowy), alloaromadendren (olejek manuka) i tymol (olejek tymiankowy). Karwakrol zidentyfikowano również w fazie lotnej nad próbkami skóry natłuszczonymi z dodatkiem olejku lebiodkowego w stężeniu 3% na masę skóry. Można przypuszczać, że spowolniony spadek emisji tego największego ilościowo składnika olejku lebiodkowego wpływa na dłuższe utrzymywanie się właściwości biostatycznych próbek skóry uszlachetnionych tym olejkami.

Metalami ciężkimi występującymi w najmniejszych ilościach w badanych olejkach był arsen oraz kadm, natomiast w największej ilości wykryto miedź (za wyjątkiem olejku manuka, gdzie przeważał nikiel), jednak w odniesieniu do wszystkich olejków nie została przekroczona dopuszczalna ilość żadnego z badanych metali ciężkich. Po wprowadzeniu olejków do skór podszewkowych, nie będą one zatem stanowiły zagrożenia dla użytkownika obuwia z nich wykonanego, ani dla otaczającego środowiska.

Uzyskane wyniki badań mikrobiologicznych dowiodły, iż olejki eteryczne pozyskane z roślin *Origanum vulgare*, *Cinnamomum verum*, *Thymus vulgaris* i wprowadzone do skóry w ilości 5% masy skóry pozwoliły na uzyskanie dobrego efektu przeciwdrobnoustrojowego, natomiast dla skór uszlachetnionych olejkami pozyskanymi z roślin *Eucalyptus globulus* i *Leptospermum scoparium* otrzymany efekt był niewystarczający. Natłuszczenie skór podszewkowych z dodatkiem olejków lebiodkowego, cynamonowego i tymiankowego w stężeniu 5% na masę skóry pozwoliło na uzyskanie dobrego i trwałego efektu przeciwdrobnoustrojowego wobec bakterii *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* oraz drożdży *Candida albicans*. Efekt ten po sześciu miesiącach przechowywania próbek nadal określany był jako dobry. W przypadku olejku lebiodkowego wprowadzonego do skóry, cechującego się najsilniejszym i najszerszym spektrum działania, wystarczające stężenie hamujące rozwój drobnoustrojów wynosiło 3%, natomiast dla olejku cynamonowego wartość ta była równa 5%. Skóry podszewkowe natłuszczone z dodatkiem olejku lebiodkowego (3%) cechował dobry i trwały efekt przeciwdrobnoustrojowy, co wykazano w badaniach po 6 i 12 miesiącach przechowywania próbek. Higieniczność skór podszewkowych można znacząco poprawić dzięki wprowadzeniu do surowca olejku lebiodkowego. Zastosowanie go w ilości 3%

na masę skóry pozwoliło na nadanie skórom właściwości przeciwdrobnoustrojowych wobec mogących powodować infekcje drożdży *Candida albicans*, grzyba strzępkowego *Scopulariopsis brevicaulis* oraz bakterii *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, utrzymujących się nawet po upływie roku od momentu natłuszczenia skóry z dodatkiem tego olejku. Wprowadzenie do skór olejku lebiodkowego w ilości 3% na masę skóry skutecznie ograniczyło wzrost i rozwój drobnoustrojów przyczyniających się do strat w przemyśle garbarskim, zwłaszcza grzybów strzępkowych *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Aureobasidium pullulans*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium funiculosum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Trichoderma viride*.

Istniały istotne statystycznie różnice w pożądalności zapachu próbek skór natłuszczonych z dodatkiem różnych olejków eterycznych. Skóry z dodatkiem olejków lebiodkowego i cynamonowego były najbardziej pożądane przez konsumenta, biorąc pod uwagę ich zapach, natomiast najmniejszą pożądalność zanotowano dla skór natłuszczonych z dodatkiem olejku manuka. Badania sensoryczne potwierdziły, iż pomiędzy skórami natłuszczonymi bez dodatku i z dodatkiem olejku lebiodkowego w stężeniu 3% na masę skóry nie występowały różnice w miękkości, natomiast skóry te różniły się pod względem miękkości w porównaniu ze skórami nienatłuszczonymi „wet-blue”, które były zdecydowanie sztywniejsze.

Wytrzymałość na rozciąganie skóry natłuszczonej z dodatkiem olejku lebiodkowego w stężeniu 3% na masę skóry oraz skóry nienatłuszczonej „wet-blue” była istotnie wyższa od wartości tego parametru w skórze natłuszczonej bez dodatku olejku, przy przyjętym poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Wydłużenie skóry natłuszczonej z dodatkiem olejku lebiodkowego (3%) nie różniło się istotnie od wydłużenia skóry nienatłuszczonej „wet-blue” oraz natłuszczonej bez dodatku olejku (przy $\alpha = 0,05$). Należy zauważyć, że skóra uszlachetniona olejkiem lebiodkowym (3%) spełniała wymagania dla skór podszevkowych w zakresie wytrzymałości na rozciąganie (>9 MPa) oraz wydłużenia ($>30\%$). Dodanie olejku lebiodkowego (3%) w trakcie procesu natłuszczenia nie wpłynęło istotnie na zmianę siły rozdzierającej skóry (przy $\alpha = 0,05$). Wartości siły rozdzierającej skór nienatłuszczonych „wet-blue” (34 N), natłuszczonych bez dodatku (37 N) i z dodatkiem olejku lebiodkowego (3%) (36 N) były do siebie zbliżone.

Słowa kluczowe: skóry podszevkowe, natłuszczenie, olejki eteryczne, olejek lebiodkowy, właściwości przeciwdrobnoustrojowe, właściwości higieniczne.

**CRACOW UNIVERSITY OF ECONOMICS
FACULTY OF COMMODITY SCIENCE
DEPARTMENT OF INDUSTRIAL COMMODITY SCIENCE**

Elżbieta Bielak

**THE EFFECT OF LINING LEATHER FINISHING WITH
ESSENTIAL OILS ON ITS HYGIENIC PROPERTIES**

Summary of doctoral thesis
written under the supervision of Professor Ewa Marcinkowska
Dr. Justyna Syguła-Cholewińska, auxiliary supervisor

KRAKÓW 2016

Lining leathers that sit inside the shoes remain in close or often in direct contact with the wearer's foot. Therefore they should be friendly to the wearer's skin, and at first place, create no health hazards. A specific microclimate inside the used shoes may be a favourable environment for developing microorganisms pathogenic to humans and causing skin infections and reinfections. This problem is of utmost importance for persons with excessive sweating of foot and vulnerable to athlete's foot and onychomycosis.

Due to harmful effects of chemical antimicrobial substances the study was undertaken on enriching cowhides for lining leathers with natural substances of antiseptic action, namely essential oils. The aim of this thesis is to determine an effect of cinnamon, eucalyptus, oregano, manuka and thyme oils used for lining leather finishing on leather antimicrobial activity, especially against shoe infesting microorganisms causing foot skin infections and diseases. The results can be used in athlete's foot prophylaxis. This infection is persistent and requires a prolonged treatment in the contemporary world.

The advances methods such as gas chromatography with mass spectrometry and absorption atomic spectroscopy were employed in the dissertation to define test materials, i.e. essential oils. The first of the methods mentioned above allowed the profiles of organic compounds present in oils to be determined, as well as in vapour phase above them. The second method enabled heavy metal content in oils to be determined.

To investigate properties of leathers enriched with natural substances the microbiological techniques were used, namely diffusion in agar plates and bacterial contact inhibition that enabled antimicrobial effect to be determined. The methods of sensory analysis allowed the desirability of leather scent after treating with essential oils and softness of leathers ungreased "wet-blue" and fatliquoring with and without an addition of oregano oil. When testing mechanical properties of leathers with antimicrobial finishing the methods enabling the determination of tensile strength, elongation and breaking strength were used. Gas chromatography with mass spectrometry allowed the vapour phase above the samples to be examined and an analysis of emission kinetics of volatile organic compounds emitted from the leathers fatliquoring with an addition of oregano oil at concentration of 3% by leather mass. The mechanical properties and scent desirability were subjected to statistical analysis by using the chi-square, Hartley, Fisher-Snedecor, Kruskal-Wallis tests.

Based on chromatographic analyses it has been found that antimicrobial compounds are present in oils and in the vapour phase above oils under examination, and this decides on antiseptic effect of leathers fatliquoring with essential oils. These compounds included among

other things eugenol (cinnamon oil), eucalyptol (eucalyptus oil), carvacrol (oregano oil), alloaromadendrene (manuka oil) and thymol (thyme oil). Carvacrol was identified also in the vapour phase above samples of the leather fatliquoring with an addition of oregano oil at concentration of 3% by leather mass. One can conclude that the slowed down drop in emission of this most abundant oregano oil compound decides on prolonged retention of biostatic properties of leathers enriched with this oil.

The less abundant heavy metals in oils under examinations were arsenic and cadmium, while copper was the most abundant element (except for manuka oil where nickel prevailed), however no allowable concentrations have been exceeded for any heavy metal under investigation. Thus, after introducing oils into lining leathers, no hazards will be posed to the wearers and environment.

The obtained results of microbiological analysis have indicated that essential oils derived from the plants *Origanum vulgare*, *Cinnamomum verum*, *Thymus vulgaris* and introduced into leather at amount of 5% by leather mass bring a good antimicrobial effect, while this effect was unsatisfactory for leathers enriched with oils taken from the plants *Eucalyptus globulus* and *Leptospermum scoparium*. By fatliquoring of lining leathers with an addition of oregano, cinnamon and thyme oils at concentration of 5% by leather mass a good and durable antimicrobial effect against bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* yeasts was obtained. This effect was still good after six month storage of samples. For oregano oil of the strongest and widest spectrum of effects introduced into leathers, a sufficient microbial inhibition was reached at concentration of 3%, while for cinnamon oil this value was 5%. Lining leathers fatliquoring with an addition of oregano oil (3%) maintained a good and permanent antimicrobial effect, as it has been proven after 6 and 12 month storage of samples. Hygienic properties of lining leathers can be improved by introducing oregano oil into raw materials. When using it at concentration of 3% by leather mass the leathers gained antimicrobial action against microorganisms that may cause infections, namely *Candida albicans* yeasts, filamentous fungus *Scopulariopsis brevicaulis* and bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and maintained it as long as one year after fatliquoring of the leather with and addition of this oil. The introduction of oregano oil into leathers at concentration of 3% by leather mass efficiently inhibited the growth and development of microbes causing losses in the tanning industry, especially the filamentous fungi *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Aureobasidium pullulans*, *Paecilomyces variotii*,

Penicillium brevicompactum, *Penicillium funiculosum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Trichoderma viride*.

There were statistically significant differences in desirability of scent for leather samples fatliquoring with an addition of various essential oils. The leathers with an addition of oregano and cinnamon oils were the most desired by consumers due to its scent, while the leathers fatliquoring with manuka oil were the least desired. The sensory evaluation confirmed that there were no softness differences between leathers fatliquoring without or with an addition of oregano oil at concentration of 3% by leather mass, while these leathers differed in softness from ungreased “wet-blue” leathers that were significantly more stiffer.

For leathers fatliquoring with oregano oil at amount of 3% by weight and ungreased “wet-blue” leathers, tensile strength was significantly higher than those of leathers fatliquoring without addition of this oil at the assumed significance level $\alpha = 0.05$. There were no significant differences in elongation for leathers fatliquoring with an addition of oregano oil (3%) and ungreased “wet-blue” and fatliquoring without addition of this oil (at $\alpha = 0.05$). It should be noted that the leather enriched with oregano oil (3%) met the requirements for lining leathers regarding tensile strength (>9 MPa) and elongation ($>30\%$). The addition of oregano oil (3%) during the fatliquoring process had no significant effect on leather breaking strength (at $\alpha = 0,05$). There were similar values of breaking strength for ungreased “wet-blue” leathers (34 N), and those fatliquoring without an addition (37 N) and with addition of oregano oil (3%) (36 N).

Keywords: lining leathers, fatliquoring, essential oils, oregano oil, antimicrobial properties, hygienic properties.