

## PHYTO-BASED PRESERVATION OF RAW SKINS FOR SALINITY REDUCTION IN TANNERY WASTEWATER

## CONSERVAREA PIEILOR CRUDE CU AJUTORUL PLANTELOR PENTRU REDUCEREA SALINITĂȚII APELOR REZIDUALE DIN TĂBĂCĂRII

Marudhamuthu VINODHKUMAR<sup>1\*</sup>, Velappan BRINDHA<sup>2</sup>, James KANAGARAJ<sup>2</sup>, Alagumuthu TAMILSELVI<sup>1</sup>, Sayeed SADULLA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centre for Human and Organizational Resources Development (CHORD), CSIR-CLRI, Chennai, India, vinodh14579@gmail.com

<sup>2</sup>Leather Process Technology Division, CSIR-CLRI

<sup>3</sup>Indian Leather Products Association, Chennai, India

### PHYTO-BASED PRESERVATION OF RAW SKINS FOR SALINITY REDUCTION IN TANNERY WASTEWATER

**ABSTRACT.** Leather industry is one of the top polluting industries albeit producing precious commodities for human use. Curing of raw skins and hides with salt is one chief deterrent increasing the Total Dissolved Solids (TDS) of water bodies and fertile lands. In this present investigation, an attempt has been made to reduce the salt used for preservation by substituting with plant extracts. Plants like *Cassia fistula* Linn. (Cassia), family *Caesalpiniaceae* and *Psidium guajava* L, family *Myrtaceae* display brilliant antimicrobial qualities. Experimental skin (goat) samples were treated with 5% Salt + 5% Cassia paste, 10% Salt + 10% Cassia paste, 15% Salt + 15% Cassia paste, 5% salt + 5% Guava paste, 10% salt + 10% Guava paste, 15% salt + 15% Guava paste and 40% salt according to the skin weights respectively. The experimental skins were preserved for 21 days and were observed for hair slip, smell and putrefaction. Estimation of protein, hydroxyproline and moisture content and microbial load were tested on the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day. On the 21<sup>st</sup> day the skins were processed into leather and their physical properties were examined and found comparable to the conventionally cured skins. Hence, this cleaner curing method helps in reducing the TDS in the effluent, thus controlling pollution caused by tanneries through salt.

**KEY WORDS:** phyto-based preservation, *Cassia fistula*, *Psidium guajava*, wastewater, salinity reduction.

### CONSERVAREA PIEILOR CRUDE CU AJUTORUL PLANTELOR PENTRU REDUCEREA SALINITĂȚII APELOR REZIDUALE DIN TĂBĂCĂRII

**REZUMAT.** Industria de piele este una dintre industriile cele mai poluanante, desi este producatoare de materii prime preicioase pentru uz uman. Conservarea pieilor crude cu sare este poluantă, conducând la creșterea substanțelor solubile totale (TDS) din apă și terenuri fertile. În cadrul prezentei investigații, s-a încercat reducerea sării utilizată pentru conservare prin substituirea acesteia cu extracte din plante. Plante precum *Cassia fistula* Linn. (Cassia), familia *Caesalpiniaceae* și *Psidium guajava* L, familia *Myrtaceae* prezintă calități antimicrobiene extraordinare. Probele experimentale de piele (capră) au fost tratate cu 5% sare + 5% pastă de cassia, 10% sare + 10% pastă de cassia, 15% sare + 15% pastă de cassia, 5% sare + 5% pastă de goyava, 10% sare + 10% pasta de goyava, 15% sare + 15% pastă de goyava, respectiv cu 40% sare, în funcție de greutatea pielii. Pieile experimentale s-au conservat timp de 21 de zile și au fost evaluate cu privire la cădereea părului, miros și putrefacție. S-au determinat conținutul de proteine, de hidroxiprolină și de umiditate și încărcătura microbiană în zilele 1, 2, 3, 7, 14 și 21. În ziua 21, pieile au fost prelucrate până la stadiul de piele finită și s-au testat proprietățile fizice, considerându-se comparabile cu pieile conservate în mod convențional. Prin urmare, această metodă ecologică de conservare ajută la reducerea TDS din efluenți, controlând astfel poluarea cauzată de tăbăcării prin utilizarea sării.

**CUVINTE CHEIE:** conservare pe bază de plante, *Cassia fistula*, *Psidium guajava*, ape reziduale, reducere salinității.

### LA CONSERVATION DES PEAUX À BASE DE PLANTES POUR RÉDUIRE LA SALINITÉ DES EAUX USÉES DES TANNERIES

**RÉSUMÉ.** L'industrie du cuir est l'une des industries plus polluantes même si elle produit des matières premières précieuses pour l'usage humain. La conservation des peaux brutes au sel est un processus polluant qui augmente le total des solides dissous (TDS) dans l'eau et les terres fertiles. Dans la présente investigation, on a fait une tentative de réduire le sel utilisé pour la conservation en le substituant aux extraits de plantes. Des plantes comme *Cassia fistula* Linn. (Cassia), famille *Caesalpiniaceae* et *Psidium guajava* L, famille *Myrtaceae* ont des qualités antimicrobiennes extraordinaires. Les échantillons de peau expérimentale (chèvre) ont été traités avec 5% sel + 5% pâte de Cassia, 10% sel + 10% pâte de Cassia, 15% sel + 15% pâte de Cassia, 5% sel + 5% pâte de goyave, 10% sel + 10% pâte de goyave, 15% sel + 15% pâte de goyave et avec 40% sel en fonction du poids de la peau brute, respectivement. Les peaux expérimentales ont été conservées pendant 21 jours et ont été analysées pour déterminer le glissement des cheveux, l'odeur et la putréfaction. On a déterminé la teneur en protéine, hydroxyproline et humidité et la charge microbienne le 1<sup>er</sup>, 2<sup>e</sup>, 3<sup>e</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> et 21<sup>st</sup> jour. Le 21<sup>st</sup> jour les peaux ont été transformées en cuir et leurs propriétés physiques ont été examinées et jugées comparables aux peaux classiquement conservées. Par conséquent, ce procédé écologique de conservation contribue à réduire le TDS dans l'effluent, contrôlant ainsi la pollution causée par les tanneries en utilisant le sel.

**MOTS CLÉS:** conservation à base de plantes, *Cassia fistula*, *Psidium guajava*, eaux usées, réduction de la salinité.

\* Correspondence to: Vinodhkumar MARUDHAMUTHU, Centre for Human and Organizational Resources Development, CSIR-CLRI, Sardar Patel Road, Adyar, Chennai, India 600020; vinodh14579@gmail.com; +91-9840249513

## INTRODUCTION

Converting raw hides and skins into leather is ancient. Since the last century, this traditional craft-oriented act has transformed into a huge industrialized and profit-making business. In transformation of hides and skins into leather, the hides and skins undergo a temporary and reversible “curing” or “preservation” method to increase the shelf life of these raw materials. Thus, curing, though not one of the essential steps/stages in leather making, has become the foremost and important link in the supply chain. Normally salt is used for preservation purposes though there are many preservation methods, both practiced as well as of academic curiosity. Salt has been identified as a pollutant. Chloride concentration in conventional tannery wastewater is about  $9 \text{ g l}^{-1}$  which represents a considerable problem for biological plants [1]. Along with the pros, this concentrate act brought in its own cons. Given the current scenario, this industry is ailing through solid and liquid waste management issues. Especially the methods the industry adopts for short term preservation of skins and hides seem easy, but bring in serious disposal problems.

There are different methods adopted in the preservation of skins for a long duration by physical methods (sun drying, controlled drying, cooling and chilling, cooled air treatment, addition of ice and use of dry ice [2]) and in chemical methods, sodium chloride is used at the level of 40–50% and is the most popular curing method [2]. The short term preservation this industry is adopting leads to serious Total Dissolved Solids (TDS) concerns [3]. This chemical method accounts to about 40% of chlorides and 55% of TDS, in the entire leather processing operations [4]. Govindasamy [5] in his study has reported that the effluents from chrome tanning industry should meet with the specific tolerance limits for chloride with  $1000 \text{ mg l}^{-1}$ , Biological Oxygen Demand (BOD) with  $30 \text{ mg l}^{-1}$ . Vlyssides [6] mentions the acceptable range for chlorides ( $\text{mg l}^{-1}$ ) as 1500–28000 composition of tannery waste liquors. The common salt based preservation chiefly accounts for the chlorides emanating in the liquid effluents of leather manufacture. The impact of salinity emanating from

## INTRODUCERE

Transformarea pieilor crude în piei finite este o îndeletnicire foarte veche. Începând cu ultimul secol, acest proces tradițional artizanal s-a transformat într-o imensă afacere industrializată și aducătoare de profit. La transformarea pieilor crude în piele finită, pieile sunt supuse unei metode temporare și reversibile de „tratare” sau „conservare” pentru a prelungi durata de depozitare a acestor materii prime. Astfel, deși nu se numără printre etapele esențiale în procesul de fabricare a pielii, a devenit cel mai important element din cadrul lanțului de aprovizionare. În mod normal, se utilizează sarea pentru conservare, deși există mai multe metode de conservare, atât practice, cât și teoretice. Sarea a fost identificată ca substanță poluantă. Concentrația de cloruri în apele uzate din tăbăcăriile convenționale este de aproximativ  $9 \text{ g l}^{-1}$ , ceea ce reprezintă o problemă considerabilă pentru plante [1]. Pe lângă avantaje, această operațiune prezintă și dezavantaje. Având în vedere scenariul actual, această industrie se confruntă cu probleme de gestionare a deșeurilor solide și lichide. În special metodele pe care le adoptă industria pentru conservarea pe termen scurt a pieilor par simple, dar aduc probleme serioase privind eliminarea deșeurilor.

S-au adoptat diferite metode de conservare a pieilor pentru o durată lungă, prin proceduri fizice (uscare la soare, uscare controlată, răcirea, tratarea cu aer rece, adăugarea de gheăță și utilizarea zăpezii carbonice [2]) și proceduri chimice, dintre care utilizarea clorurii de sodiu la nivel de 40-50% este cea mai des utilizată metodă de conservare [2]. Metodele de conservare pe termen scurt pe care le adoptă această industrie conduc la probleme privind substanțele solubile totale (TDS) [3]. Acestei metode chimice îi revin aproximativ 40% din cloruri și 55% din TDS, din totalul operațiunilor de prelucrare a pieilor [4]. Govindasamy [5] a raportat în studiul său că efluenții din procesul tăbăcire cu crom trebuie să se încadreze în limitele de toleranță specifice pentru clorură, de până la  $1000 \text{ mg l}^{-1}$ , iar pentru consumul biochimic de oxigen (CBO), de până la  $30 \text{ mg l}^{-1}$ . Vlyssides [6] menționează intervalul acceptabil pentru cloruri ( $\text{mg l}^{-1}$ ) între 1500-28000, din compoziția apelor reziduale din tăbăcării. Conservarea uzuală pe bază de sare este principala responsabilităță pentru clorurile conținute în efluenții de la fabricarea pielii. Impactul salinității din tăbăcărie

tannery environment to the ecosystem has been reviewed by Sayeed Sadulla [7] in his article.

Haydar *et al.* [8] have tried reducing the impurities from the effluent and the percentage removal efficiency for turbidity, Total Suspended Solids (TSS), Chemical Oxygen Demand (COD) and chromium was found to be 98.7-99.8, 94.3-97.1, 53.3-60.9, and 98.9-99.7%, respectively. These impurities can be abated only by eliminating the causative from the root itself and adopting a greener means like moving towards eco-friendly method of preservation where the TDS, BOD, COD can be controlled without any additional treatment methods. Research is underway to substitute or minimize the salt used in curing process globally. Phyto-based preservation is one of such attempts adopting an eco-friendly approach. Plants are rich in a wide variety of secondary metabolites such as tannins, terpenoids, alkaloids, flavonoids, glycosides etc., that have antimicrobial properties [9, 10] which are indispensable properties for any preservant, temporary or permanent. The plants so far discovered to have curing property are Neem [11], *Acalypha indica* [12], *Weddilia chinensis*, *Cassia alata*, *Clerodendron phlomidis*, *Solanum trilobatum*, *Calotropis procera* [13], *Semecarpus anacardium* nut extract [14].

In the present study, *Cassia fistula* and *Psidium guajava* are complemented with the salt curing. *Cassia fistula* or Indian Laburnum belongs to the family *Caesalpiniaceae* [15]. Tzakou and his colleagues [16] identified forty-four chemical compounds and the other phytochemicals reported to be present in the leaves of *C. fistula* and they are Anthraquinones like Rhein glucoside, Rhein, Fistulic acid, Sennoside A & B, Chrysophanol and Physcion, 9-epiafzelechin, 3-O-B-D-Glucopyranoside, 7-bioflavonoids and two Triflavonoids together with Epiafzelechin and Procyanidin B-2 [17-19]. The young and old leaves of the plant contain the highest amount of Phenolic, Flavonoid and Proanthocyanidin contents [20]. Leaves and flowers contain Anthraquinone, Tannin, Oxyanthraquinone, Rhein and Volatile oils [21]. *Cassia fistula* is found to be an effective antibacterial agent against *Escherichia coli*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* and *S. aureus* and antifungal against *Microsporum*

asupra ecosistemului a fost analizat de Sayeed Sadulla [7], în articolul său.

Haydar și colab. [8] au încercat să reducă impuritățile din efluенți, iar eficiența de îndepărțare procentuală pentru turbiditate, substanțe solide în suspensie totale (TSS), consumul chimic de oxigen (CCO) și crom s-a dovedit a fi 98,7-99,8, 94,3-97,1, 53,3-60,9 și respectiv 98,9-99,7%. Aceste impurități pot fi reduse numai prin eliminarea cauzelor și prin adoptarea unor mijloace mai ecologice, cum ar fi trecerea la metoda ecologică de conservare prin intermediul căreia TDS, CBO, CCO pot fi controlate fără metode de tratare suplimentare. Se desfășoară cercetări la nivel global pentru a înlocui sau minimiza sarea utilizată în procesul de conservare. Conservarea pe bază de plante este una dintre aceste încercări de a adopta o abordare ecologică. Plantele au un conținut bogat de metaboliți secundari de largă varietate, cum ar fi taninuri, terpenoide, alcaloizi, flavonoide, glicozide, etc., care au proprietăți antimicrobiene [9, 10], proprietăți indispensabile pentru orice tip de conservant, temporar sau permanent. Plantele cu proprietăți de conservare descoperite până în prezent sunt arborele de Neem [11], *Acalypha indica* [12], *Weddilia chinensis*, *Cassia alata*, *Clerodendron phlomidis*, *Solanum trilobatum*, *Calotropis procera* [13], extract de nuci *Semecarpus anacardium* [14].

În studiul de față, s-au utilizat *Cassia fistula* și *Psidium guajava* în combinație cu metoda conservării cu sare. *Cassia fistula* sau salcâmul indian aparține familiei *Caesalpiniaceae* [15]. Tzakou și colab. [16] au identificat patruzeci și patru de compuși chimici și alte fitochimicale prezente în frunzele de *C. fistula* și sunt antrachinone precum glucozida de reină, reina, acidul fistulic, senozida A & B, crisofanolul și fisciona, 9-epiafzelechina, 3-OBD-glucopiranozida, 7-bioflavonoidele și două triflavonoide împreună cu epiafzelechina și procianidina B-2 [17-19]. Frunzele tinere și vechi ale plantei conțin cea mai mare cantitate de fenoli, flavonoide și proantocianidină [20]. Frunzele și florile conțin antrachinonă, tanin, oxiantrachinonă, reină și uleiuri volatile [21]. *Cassia fistula* se dovedește a fi un agent antibacterian eficient împotriva *Escherichia coli*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* și *S. aureus* și antifungic, cu acțiune împotriva *Microsporum*

*gypseum*, *Trichophyton rubrum* and *Penicillium marneffei* [22-24]. Many pharmacological studies have demonstrated the antioxidant, hepatoprotection, anti-allergy, antimicrobial, antigenotoxic, cytotoxic, cardioactive, anticough, antidiabetic and anti-rheumatic effect of *P. guajava* [25, 26].

The main objective of this investigation is to study the curing properties of "Phyto-extract" of *Cassia fistula* and *Psidium guajava* leaves after the application on freshly flayed goat skins. The reduced use of common salt and the resultant mileage in disposal of the liquor effluent are relevant gains with respect to this eco-friendly intervention. The experimental skins were studied for 21 days. Afterwards, the leathers made out of the preserved skins were tested for their physical properties and colour characteristics.

## MATERIALS AND METHODS

### Collection of Plant Materials

The leaves of *Cassia fistula* and *Psidium guajava* were collected from Adyar, Chennai, India. Then the washed leaves were shade-dried and ground to powder (2 mm mesh). The powder was stored in a brown bottle for future use.

### Preparation of Solvent Extract

Ethanol, Hexane and distilled water extracts were prepared from 5 g of ground plant leaves (*Cassia fistula* and *Psidium guajava*) by suspending them in 25 ml of solvents (Ethanol, Hexane and distilled water respectively) in a shaker for 72 hrs. Then, the respective extracts were filtrated with Whatmann filter paper No 1 and evaporated using rotary evaporator [27]. The obtained extracts were stored at 4°C for further analysis.

### Antimicrobial Assay of Phyto-extract on Isolated Microbes

Screening of antibacterial potential of the prepared extracts against *Bacillus* sp., *Klebsiella* sp. and *Proteus* sp. were performed by agar well diffusion method according to NCCLS Guidelines [28] in MHA (Mueller Hinton Agar) plates.

*gypseum*, *Trichophyton rubrum* și *Penicillium marneffei* [22-24]. Multe studii farmacologice au demonstrat efectele antioxidantă, hepatoprotectoare, anti-alergice, antimicrobiene, antigenotoxice, citotoxice, cardioactive, anti-tuse, antidiabetice și anti-reumatice ale *P. guajava* [25, 26].

Obiectivul principal al acestei investigații este de a studia proprietățile curative ale extractelor de frunze de *Cassia fistula* și *Psidium guajava* după aplicarea acestora pe piei de capră proaspăt jupuite. Utilizarea redusă a sării comune și conținutul care rezultă la eliminarea efluentului lichid sunt avantajele relevante ale acestei intervenții ecologice. Pieile experimentale au fost studiate timp de 21 de zile. Ulterior, pieile finite prelucrate din piele conservată au fost testate pentru a determina proprietățile fizice și caracteristicile de culoare ale acestora.

## MATERIALE ȘI METODE

### Colectarea materialului vegetal

Frunzele de *Cassia fistula* și *Psidium guajava* au fost colectate din Adyar, Chennai, India. Frunzele spălate au fost uscate la umbră și măcinate până la obținerea unei pulberi (sită de 2 mm). Pulberea a fost depozitată într-o sticlă de culoare brună pentru utilizare ulterioară.

### Prepararea extractului cu solvent

S-au preparat extracte apoase în etanol, hexan și apă distilată din 5 g de frunze de plante măcinata (Cassia fistula și Psidium guajava) prin suspensia acestora în 25 ml de solvent (etanol, hexan, respectiv, apă distilată) într-un agitator, timp de 72 de ore. Apoi, extractele respective au fost filtrate prin hârtie de filtru Whatmann nr. 1 și s-a evaporat apa cu ajutorul evaporatorului rotativ [27]. Extractele obținute au fost depozitate la 4°C pentru analize ulterioare.

### Testul antimicrobian al extractelor vegetale asupra microbilor izolați

S-a determinat potențialul antibacterian al extractelor preparate contra *Bacillus* sp., *Klebsiella* sp. și *Proteus* sp. prin metoda difuzimetrică cu godeuri în agar în conformitate cu liniile directoare NCCLS [29] în plăci MHA (agar Mueller Hinton).

### **Test Microorganisms**

The collagen degrading bacteria (*Bacillus* sps., *Klesbeilla* sps. and *Proteus* sps.) isolated from goat skins were selected for testing antimicrobial activity of *Cassia fistula* and *Psidium guajava* extracts. Fresh cultures were maintained as nutrient agar slants in screw-capped bottles and stored at 4°C. All cultures were checked for viability and purity by regular plating and biochemical tests. Test cultures were prepared by transferring a loop full of bacteria from the stock culture to nutrient broth and incubated at 37°C for 24 hrs.

### **Antibacterial Activity (Well Diffusion Method)**

The anti-bacterial activity of the Ethanol, Hexane and distilled water extracts of *Cassia fistula* and *Psidium guajava* were tested against *Bacillus* sps., *Klebsiella* sps. and *Proteus* sps. by Agar well diffusion method. The agar-well diffusion method has been used to determine the effect of extracts on bacterial species *in vitro*. At first, the suspensions (with standard turbidity compared to that of the McFarland standard of 0.5) of each of the test bacteria; i.e., *Bacillus* sps., *Klebsiella* sps. and *Proteus* sps. were spread evenly over sterile MHA plates. Wells were then made on the seeded MHA plates by means of sterile cork-borer. Each of the samples was then introduced separately in a concentration of 100 µl with a residual herbal medicine concentration. Presence of clear zone around the sample (if any) was analyzed for the existence of the antibacterial activity of the samples after incubation of the plates for 24 hrs. The diameter of the inhibition zone was measured in mm and recorded.

### **Application in Leather Industry**

#### **Skin Curing**

Freshly flayed 5 goat skins were obtained from a local slaughter house and each skin was cut into four quarters. In each of the quarter section of the skin, combination of *Cassia fistula* leaves paste + salt and *Psidium guajava* leaves paste + salt were applied. The Table 1 explains the experimental design for the study. All the curing materials were applied on the flesh side of the skins based on the raw green weight of the skins.

### **Microorganisme pentru testare**

Bacteriile care degradează colagenul (*Bacillus* sp., *Klesbeilla* sp. și *Proteus* sp.) izolate din piele de capră au fost selectate pentru testarea activității antimicrobiene a extractelor de *Cassia fistula* și *Psidium guajava*. Culturile proaspete s-au menținut în medii nutritive în flacoane cu capac cu filet și depozitate la 4°C. Viabilitatea și puritatea tuturor culturilor au fost verificate prin placare regulată și teste biochimice. Culturile de testat au fost preparate prin transferarea unei anse bacteriologice din cultura stoc în mediul nutritiv și au fost incubate la 37°C timp de 24 ore.

### **Activitatea antibacteriană (metoda difuzimetrică cu godeuri)**

Activitatea antibacteriană a extractelor în etanol, hexan și apă distilată ale *Cassia fistula* și *Psidium guajava* a fost testată împotriva *Bacillus* sp., *Klebsiella* sp. și *Proteus* sp. prin metoda difuzimetrică cu godeuri în agar. Metoda difuzimetrică cu godeuri în agar a fost utilizată pentru a determina efectul extractelor asupra speciilor bacteriene *in vitro*. Mai întâi, suspensiile (cu turbiditate standard, comparativ cu cea a standardului McFarland de 0,5) fiecarei bacterii testate, și anume, *Bacillus* sp., *Klebsiella* sp. și *Proteus* sp., au fost repartizate în mod egal în plăci sterile MHA. S-au făcut apoi godeuri pe plăcile însămânțate cu ajutorul unei sonde sterile. Fiecare dintre probe a fost apoi introdusă separat într-o concentrație de 100 µl cu o concentrație reziduală de medicament pe bază de plante. Prezența zonei clare în jurul probei (dacă a existat) a fost analizată pentru a determina existența activității antibacteriene a probelor după incubarea plăcilor timp de 24 de ore. Diametrul zonei de inhibiție a fost măsurat în mm și înregistrat.

### **Aplicarea în industria de pielărie**

#### **Conservarea pieilor**

S-au obținut cinci piei de capră proaspăt jupuite dintr-un abator local și fiecare piele a fost tăiată în patru sferturi. Pe fiecare dintre cele patru sferturi s-a aplicat o combinație de pastă de frunze de *Cassia fistula* + sare și pastă de frunze de *Psidium guajava* + sare. Tabelul 1 ilustrează designul experimental pentru studiu. Toate materialele de conservare au fost aplicate pe partea de carne a pieilor raportate la greutatea pieilor crude.

These experimental skins were allowed to be preserved at an ambient temperature of 31°C for 21 days.

### *Sample Collection*

During the preservation period the experimental skins were physically examined for hair slip, smell and putrefaction. And small pieces of skins were collected on the 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day and tested for biochemical parameters (moisture content, extractable hydroxyproline content and protein content) and microbial load.

On the 21<sup>st</sup> day, both the control and preserved experimental skins were processed into leather. The soak liquors were collected and studied for the effluent characteristics (COD, TDS and TS). The processed leathers were tested for their physical properties, colour fastness. The results were compared with the control at the end.

### *Biochemical Parameters*

#### *Determination of Moisture Content*

The experimental skin sample was weighed (25 g) with silica crucible and noted as initial weight value (A). This was then placed in hot air oven at 98°C for 3 hrs, cooled in a desiccator and weighed. This will give the final weight (B). The percentage of moisture content is measured by:

$$\begin{aligned} \text{\% of moisture content} &= (A-B) / A \times 100 \\ \text{\% din con\intinutul de umiditate} &= (A-B) / A \times 100 \end{aligned} \quad (1)$$

#### *Hydroxyproline Estimation*

The preserved skin sample (5 g) was suspended in ten times distilled water at 40-50 rpm for 30 minutes. The suspended solution was analysed for hydroxyproline by Woessner method [29]. A small sample of the suspended solution was hydrolysed with 6 N HCl overnight at 130°C. To this, 1 ml of Chloramine T was shaken for a few minutes and allowed to stand for 20 minutes. To this, 1 ml of perchloric acid is added and mixed well and allowed to stand for 5 minutes, followed by 1 ml of PDAB (p-dimethylaminobenzaldehyde) and mixed well. Then the tubes are placed at 60°C in a water

Acstea piei experimentale au fost păstrate la o temperatură ambiantă de 31°C timp de 21 de zile.

### *Colectarea probelor*

În timpul perioadei de conservare, pieile experimentale au fost examinate fizic pentru a determina gradul de înlăturare al părului, miroslu și putrefacția. S-au colectat bucați mici de piei după 1, 3, 7, 14 și 21 de zile și s-au testat pentru determinarea parametrilor biochimici (conținutul de umiditate, conținutul de hidroxiprolină extractibilă și conținutul de proteine) și a încărcăturii microbiene.

În ziua 21, atât piele martor, cât și cele experimentale conservate au fost prelucrate până la stadiul de piele finită. Lichidul de la înmuiere a fost colectat și studiat pentru a determina caracteristicile efluentalui (CCO, TDS și TS). Pieile prelucrate au fost testate pentru a determina proprietățile fizice și rezistența culorii acestora. Rezultatele au fost comparate cu cele ale probelor martor la final.

### *Parametrii biomecanici*

#### *Determinarea con\intinutului de umiditate*

Proba de piele experimentală a fost cântărită (25 g) într-un creuzet de silice și s-a notat valoarea inițială a greutății (A). Proba a fost apoi pusă în cuporul cu aer cald la 98°C timp de 3 ore, s-a răcit într-un desicator și s-a cântărit. S-a obținut astfel greutatea finală (B). Procentul de umiditate s-a măsurat prin:

$$\begin{aligned} \text{\% of moisture content} &= (A-B) / A \times 100 \\ \text{\% din con\intinutul de umiditate} &= (A-B) / A \times 100 \end{aligned} \quad (1)$$

### *Estimarea hidroxiprolinei*

Proba de piele conservată (5 g) a fost suspendată în apă distilată de zece ori la 40-50 rpm timp de 30 minute. Soluția în suspensie a fost analizată pentru a determina conținutul de hidroxiprolină prin metoda Woessner [30]. O probă mică din soluția de suspensie s-a hidrolizat cu acid clorhidric 6 N peste noapte la 130°C. S-a adăugat 1 ml de cloramină T și s-a agitat timp de câteva minute, apoi s-a lăsat să stea timp de 20 de minute. S-a adăugat 1 ml de acid percloric și s-a amestecat bine, apoi s-a lăsat să stea timp de 5 minute, urmat de 1 ml de PDAB (p-dimethylaminobenzaldehidă)

bath for 20 minutes and then cooled with tap water for 5 minutes. The absorbency of the solution is determined spectrophotometrically at 557 nm. The hydroxyproline values may be determined directly from the standard curve. The results are expressed in  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

#### *Protein Estimation*

The supernatant solution (1 ml) was obtained after suspending the experimental skin sample in ten times the distilled water. To the supernatant sample, alkaline copper sulphate reagent was added and mixed well and incubated at room temperature for 10 minutes. To this 0.2 ml of the Folin-Ciocalteu solution was added and incubated for 30 minutes and read spectrophotometrically at 600 nm [30]. The results are expressed in  $\text{mg ml}^{-1}$ .

#### *Microbial Study*

##### *Determination of Bacterial Load*

The experimental cured skin (10 g) was suspended in 90 ml of sterile distilled water and kept in an orbital shaker at 40-50 rpm for 30 minutes. The suspended solution (1 ml) was serially diluted in 9 ml normal saline till  $10^{-3}$  dilution. From the diluted tube 0.1 ml was poured in sterile nutrient agar plates before solidifying and rotated clockwise and anticlockwise for five times and allowed to solidify (carried out by pour plate technique) and incubated for 24 hrs at 37°C. Then the numbers of viable bacterial colonies were counted in  $\text{CFU ml}^{-1}$ .

##### *Analysis of Exhaust Soak Liquor Generated*

##### *COD*

COD of soak liquors was determined according to ISO 15705:2002. To the soak liquor (2.5 ml) a pinch of mercuric sulphate was added, followed by 1.5 ml of potassium dichromate and digested at 148°C for 2 hrs in COD digester. The digested solution with 3 or 4 drops of Ferroin indicator was titrated against Ferrous Ammonium Sulphate (FAS). The results are reported in  $\text{mg l}^{-1}$ .

și s-a amestecat bine. Apoi eprubetele au fost introduse într-o baie de apă la 60°C timp de 20 minute și apoi s-au răcit cu apă de la robinet timp de 5 minute. Absorbanța soluției s-a determinat spectrofotometric la 557 nm. Valorile hidroxiprolinei pot fi determinate direct din curba standard. Rezultatele sunt exprimate în  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

#### *Estimarea proteinei*

Soluția de supernatant (1 ml) s-a obținut după suspendarea probei de piele experimentală în apă distilată de zece ori. Peste proba de supernatant s-a adăugat reactiv alcalin sulfat de cupru și s-a amestecat bine, apoi s-a incubat la temperatura camerei timp de 10 minute. S-au adăugat 0,2 ml de soluție Folin-Ciocalteu și s-a incubat timp de 30 minute, apoi s-a citit spectrofotometric la 600 nm [30]. Rezultatele sunt exprimate în  $\text{mg ml}^{-1}$ .

#### *Studiu microbial*

##### *Determinarea încărcării bacteriene*

Pielea experimentală conservată (10 g) a fost suspendată în 90 ml de apă distilată sterilă și s-a menținut într-un agitator orbital la 40-50 rpm timp de 30 minute. Soluția de suspensie (1 ml) a fost diluată în serie în 9 ml de soluție salină normală până la o diluare de  $10^{-3}$ . Din eprubeta cu soluție diluată s-a turnat 0,1 ml în plăci cu agar steril înainte de solidificare și s-au rotit în sens orar și antiorar de cinci ori, apoi s-au lăsat să se solidifice (prin tehnica de turnare în placă) și s-au incubat timp de 24 ore la 37°C. Apoi, s-au numărat coloniile de bacterii viabile în  $\text{CFU ml}^{-1}$ .

##### *Analiza apei reziduale de la înmuiere*

##### *Consumul chimic de oxigen (CCO)*

CCO al efluentilor de la înmuiere a fost determinat în conformitate cu ISO 15705:2002. Peste soluția de înmuiere (2,5 ml) s-a adăugat puțin sulfat mercuric, urmat de 1,5 ml de dicromat de potasiu și s-a digerat la 148°C, timp de 2 ore în digestorul CCO. Soluția digerată cu 3 sau 4 picături de indicator Ferroin a fost titrată cu sulfat de amoniu feros (FAS). Rezultatele sunt raportate în  $\text{mg l}^{-1}$ .

$$\text{COD} = \frac{(B - T) \times \text{Normality of FAS} \times 8 \times 1000 \times \text{Dilution Factor (mg l}^{-1})}{\text{Sample volume}} \quad (2)$$

*(B - T) x normalitatea FAS x 8 x 1000 x factorul de diluie (mg l}^{-1})*  
*Volum probă*

where, B = Water Blank; T = Test Sample

#### TDS

An evaporating dish was washed three times and dried. The soak liquor was stirred, 50 ml of sample was pipetted out and filtered using a filter paper. The filtrate was transferred onto the dried dish in hot air oven, which was then cooled down in a desiccator and weighed. The result was expressed in mg l<sup>-1</sup>.

$$\text{TDS in mg l}^{-1} = (A - B) \times 1000 / \text{Volume of sample taken}$$

$$\text{TDS în mg l}^{-1} = (A - B) \times 1000 / \text{Volumul probei studiate} \quad (3)$$

where, A = weight of dried residue + dish, mg; B = weight of dish, mg.

#### TS (Total Solids)

Empty weight of a clean dry dish was taken. With constant stirring 50 ml of the soak liquor sample was taken a dry dish. The content was evaporated in hot air oven and cooled. The dry weight of the dish was expressed in mg l<sup>-1</sup>.

$$\text{TS in mg l}^{-1} = (A - B) \times 1000 / \text{Volume of sample taken}$$

$$\text{TS în mg l}^{-1} = (A - B) \times 1000 / \text{Volumul probei studiate} \quad (4)$$

where, A = weight of dried residue + dish, mg; B = weight of dish, mg.

### Leather Quality Analysis

#### Physical Characteristics of Crust Leathers

The leather samples made from control and experimental samples were taken for physical testing measurements and the samples were cut from the official sampling position (IUP 2 method). The leather samples were conditioned at 20±2°C and 65±4% RH for 48 hours before the study. The tensile strength, elongation at break, tear strength and grain crack

unde B = proba de apă martor; T = proba de testat

#### Substanțe solubile totale (TDS)

S-a spălat de trei ori o capsulă de evaporare și s-a uscat. S-a agitat lichidul de înmuiere, s-au luat cu o pipetă 50 ml de probă și s-au filtrat folosind hârtie de filtru. Filtratul a fost transferat în capsula uscată în cuporul cu aer cald și a fost apoi răcit într-un desicator și cântărit. Rezultatul a fost exprimat în mg l<sup>-1</sup>.

unde A = greutatea reziduului uscat + capsulă, mg; B = greutatea capsulei, mg.

#### Substanțe solide totale (TS)

S-a cântărit greutatea unei capsule curate și uscate. Agitând constant, s-au luat 50 ml din proba de efluent de la înmuiere într-o capsulă uscată. Conținutul a fost evaporat în cuporul cu aer cald și s-a răcit. Greutatea uscată a capsulei a fost exprimată în mg l<sup>-1</sup>.

unde A = greutatea reziduului uscat + capsulă, mg; B = greutatea capsulei, mg.

#### Analiza calității pielii

#### Caracteristicile fizice ale pieilor crust

Probele de piele finită realizate din probele martor și din cele experimentale au fost supuse încercărilor fizice, probele fiind tăiate conform metodei oficiale de prelevare (metoda IUP 2). Probele de piele au fost condiționate la 20±2°C și 65±4% RH timp de 48 de ore înainte de studiu. S-au determinat rezistența la rupere, alungirea la rupere, rezistența la sfâșiere și rezistența

strength were measured as per IUP 6, IUP 8 and IUP 9 methods respectively.

#### *Estimation of Colour Difference*

The control and optimized experimental crust leathers were subjected to the reflectance measurements using a Milton Roy colour mate HDS instrument. Colour measurement ( $L$ ,  $a$ ,  $b$ ,  $h$  and  $C$ ) was recorded and the total colour difference ( $\Delta E$ ) and hue difference ( $\Delta H$ ) were calculated using the following equations:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad (5)$$

$$\Delta H = \sqrt{\Delta E^2 - \Delta L^2 - \Delta C^2} \quad (6)$$

where  $\Delta E$  = Overall colour difference;  $\Delta L$  = Lightness difference;  $\Delta a$  and  $\Delta b$  = difference of 'a' and 'b' values, where 'a' represents the red and green axis and 'b' represents the yellow and blue axis;  $\Delta H$ , hue difference,  $\Delta C$ , chromaticity difference.

## RESULTS AND DISCUSSION

The leaf extracts of *Cassia fistula* and *Psidium guajava* were studied for their antibacterial activities against collagen degrading bacteria. The ethanol, hexane and water extracts of *Cassia fistula* and *Psidium guajava* leaf were dark brown, dark green and brown in colour. The Ethanol, Hexane and water extracts of *Psidium guajava* leaf appeared to be dark brown, dark green and brown in colour respectively.

Table 1: Antibacterial activity of *Cassia fistula* extracts  
Tabelul 1: Activitatea antibacteriană a extractelor de *Cassia fistula*

Name of the bacteria <i>Denumirea bacteriei</i>	Zone of clearance in mm <i>Zona de inhibiție în mm</i>		
	Ethanol <i>Etanol</i>	Hexane <i>Hexan</i>	Water <i>Apă</i>
<i>Bacillus sp.</i>	1.5	1.3	NIL*
<i>Klebsiella sp.</i>	1.9	0.9	NIL*
<i>Proteus sp.</i>	1.5	1.2	0.8

\*NIL - No clear zone was noted

\*NIL - Nu s-a observat o zonă de inhibiție clară

feței la crăpare conform metodelor IUP 6, IUP 8, respectiv IUP 9.

#### *Estimarea diferenței de culoare*

Piele crust martor și cele experimentale optimizate au fost supuse măsurătorilor de reflectanță folosind un instrument HDS Milton Roy de determinarea culorii. Măsurarea culorii ( $L$ ,  $a$ ,  $b$ ,  $h$  și  $C$ ) a fost înregistrată, iar diferența de culoare totală ( $\Delta E$ ) și diferența de nuanță ( $\Delta H$ ) s-au calculat cu ajutorul următoarelor ecuații:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad (5)$$

$$\Delta H = \sqrt{\Delta E^2 - \Delta L^2 - \Delta C^2} \quad (6)$$

unde  $\Delta E$  = diferența de culoare în ansamblu;  $\Delta L$  = diferența de luminozitate;  $\Delta a$  și  $\Delta b$  = diferența valorilor „a” și „b”, unde „a” reprezintă axa roșu-verde, iar „b” reprezintă axa galben-albastru;  $\Delta H$  = diferența de nuanță,  $\Delta C$  = diferența cromatică.

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

S-au studiat extractele de frunze de *Cassia fistula* și *Psidium guajava* în privința activității antibacteriene a acestora împotriva bacteriilor care degradează colagenul. Extractele în etanol, hexan și apă ale frunzelor de *Cassia fistula* și *Psidium guajava* au avut culorile maro închis, verde închis și maro. Extractele în etanol, hexan și apă din frunzele de *Psidium guajava* au avut culorile maro închis, verde închis, respectiv maro.

Table 2: Antibacterial activity of *Psidium guajava* extracts  
 Tabelul 2: Activitatea antibacteriană a extractelor de *Psidium guajava*

Name of the bacteria <i>Denumirea bacteriei</i>	Zone of clearance in mm <i>Zona de inhibiție în mm</i>		
	Ethanol <i>Etanol</i>	Hexane <i>Hexan</i>	Water <i>Apă</i>
<i>Bacillus sp.</i>	2.3	1.1	NIL*
<i>Klebsiella sp.</i>	1.9	1.1	NIL*
<i>Proteus sp.</i>	1.7	2	1.2

\*NIL - No clear zone was noted

\*NIL - Nu s-a observat o zonă de inhibiție clară

The study on antibacterial activity of *Cassia fistula* and *Psidium guajava* extracts are recorded in Tables 1 and 2 respectively. From the results, it is evident that there is a good antibacterial activity for Ethanolic extracts of *Cassia fistula* and *Psidium guajava* as seen from their zone of clearance of 1.5 mm and 2.3 mm, respectively, against *Bacillus sp.* The Ethanolic extracts of *Cassia fistula* and *Psidium guajava* leaves produced a zone of clearance of 1.9 mm against *Klebsiella sp.* also. The Ethanolic extract of *Cassia fistula* leaves and the Hexane extract of *Psidium guajava* leaves displayed 1.5 mm and 2.0 mm zones of clearance, respectively, against *Proteus sp.* Thus, the antibacterial study revealed significant antibacterial activity of *Cassia fistula* and *Psidium guajava* against bacteria isolated from skins showing collagenolytic and gelatine liquefying behaviours. Studies by Nayan R. Bhalodia and V. J. Shukla [31] have also shown the antibacterial potential of *Cassia fistula* against Gram positive and Gram negative bacteria. Biswas *et al.* [32] have studied and shown the antibacterial activity of *Psidium guajava* against Gram positive and Gram negative bacteria. Thus, evidences in general and our own experiments in specific stamp the candidacy of *Cassia fistula* and *Psidium guajava* as potential preservants of skin against bacterial invasion.

Rezultatele studiului privind activitatea antibacteriană a extractelor de *Cassia fistula* și *Psidium guajava* sunt prezентate în Tabelele 1 și 2. Rezultatele arată clar că extractele etanolice de *Cassia fistula* și *Psidium guajava* au o activitate antibacteriană bună, aşa cum se vede din zona de inhibiție de 1,5 mm, respectiv 2,3 mm, împotriva *Bacillus sp.* De asemenea, extractele etanolice de *Cassia fistula* și *Psidium guajava* au determinat o zonă de inhibiție de 1,9 mm împotriva *Klebsiella sp.*. Extractul etanic de *Cassia fistula* și extractul în hexan al *Psidium guajava* au prezentat o zonă de inhibiție de 1,5 mm, respectiv 2,0 mm, împotriva *Proteus sp.* Astfel, studiul antibacterian a relevat activitatea antibacteriană semnificativă a extractelor de *Cassia fistula* și *Psidium guajava* împotriva bacteriilor izolate din piei care prezintă comportament de lichefiere a colagenului și gelatinei. Studiile efectuate de către [Nayan R. Bhalodia și V. J. Shukla](#) [31] au arătat, de asemenea, potențialul antibacterian al *Cassia fistula* împotriva bacteriilor Gram pozitive și Gram negative. Biswas și colab. [32] au studiat și demonstrat activitatea antibacteriană a *Psidium guajava* împotriva bacteriilor Gram pozitive și Gram negative. Astfel, dovezile existente, în general, și propriile noastre experimente, în particular, demonstrează potențialul extractelor de *Cassia fistula* și *Psidium guajava* de a conserva și proteja pielea împotriva invaziei bacteriene.

Table 3: Concentration of salt and *Cassia fistula* extract,  
*Psidium guajava* extracts applied on the skin based on its green weight  
Tabelul 3: Concentrația de sare și extracte de *Cassia fistula*  
și *Psidium guajava* aplicate pe piele relativ la greutatea pielii crude

Sample no. Nr. probă	% based on green weight of the skin % relativ la greutatea pielii crude		
	Salt % Sare %	Leaves extract % Extract plante % ( <i>Cassia Fistula</i> )	Leaves extract % Extract plante % ( <i>Psidium guajava</i> )
1	40	Nil <i>Nul</i>	Nil <i>Nul</i>
2	15	15	Nil <i>Nul</i>
3	15	10	Nil <i>Nul</i>
4	15	5	Nil <i>Nul</i>
5	10	15	Nil <i>Nul</i>
6	10	10	Nil <i>Nul</i>
7	10	5	Nil <i>Nul</i>
8	5	15	Nil <i>Nul</i>
9	5	10	Nil <i>Nul</i>
10	5	5	Nil <i>Nul</i>
11	15	Nil <i>Nul</i>	15
12	15	Nil <i>Nul</i>	10
13	15	Nil <i>Nul</i>	5
14	10	Nil <i>Nul</i>	15
15	10	Nil <i>Nul</i>	10
16	10	Nil <i>Nul</i>	5
17	5	Nil <i>Nul</i>	15
18	5	Nil <i>Nul</i>	10
19	5	Nil <i>Nul</i>	5

In the experiments, the *Cassia fistula* and *Psidium guajava* with different combinations of salt as mentioned in Table 3 were preserved for 21 days. During the organoleptic evaluation of the experimental skins preserved with the paste of *Cassia fistula* and *Psidium guajava* showed hair slip, smell and putrefaction on the 3<sup>rd</sup> day for samples 5, 8, 9, 10, hence were discarded. But there was no hair slip, smell and putrefaction for samples no. 1, 2, 3, 4, 6, 7 and 11, hence they were preserved for 21 days. These observations indicate the autolysis and bacterial degradation of experimental skins. The skins were monitored and studies were carried out in the incubation periods. It seemed that 15% leaves extract with 15% salt and 10% leaves extract with 10% salt gave the satisfactory preservation system.

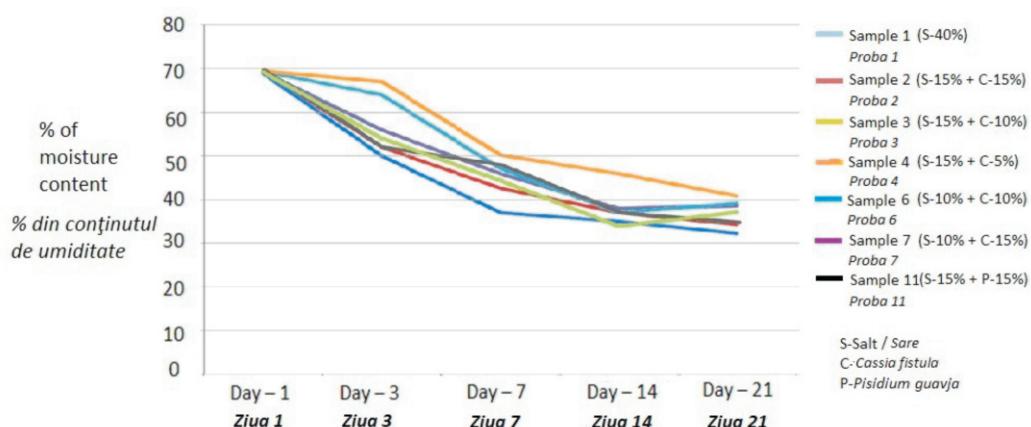


Figure 1. Moisture content of the experimental skins in percentage  
Figura 1. Conținutul de umiditate al pieilor testate, exprimat în procente

From the Figure 1, it is seen that the moisture contents of experimental skins were around 70% on the first day and there was a steady decrease in the moisture contents of up to 40% after 21 days of preservation. The moisture content of the skin is a crucial factor as the microbes like bacteria need moisture for their growth and survival. Whereas the conventional salt cured skins showed up to 30% reduction in the moisture content after 21 days of preservation, similar experiments carried out with Para Chloro Meta Cresol (PCMC) also were reported to show a 40% reduction in moisture content [33]. Salt based preservation is efficient because of

În experimentele de față, pieile au fost conservate timp de 21 de zile utilizând *Cassia fistula* și *Psidium guajava* în diferite combinații cu sare, aşa cum se menționează în Tabelul 3. În urma evaluării organoleptice a pieilor experimentale conservate cu pastă de *Cassia fistula* și *Psidium guajava* s-au observat căderea părului, miros și putrefacție în a 3-a zi în cazul probelor 5, 8, 9, 10; prin urmare, acestea au fost eliminate. Pe de altă parte, în cazul probelor 1, 2, 3, 4, 6, 7 și 11 nu s-au observat căderea părului, miros și putrefacție; prin urmare, aceste probe au fost conservate timp de 21 de zile. Aceste observații indică autoliza și degradarea bacteriană a pieilor experimentale. Pieile au fost monitorizate și s-au efectuat studii în perioadele de incubație. Sistemul de conservare satisfăcător a constat în combinarea a 15% extract de frunze cu 15% sare și 10% extract de frunze cu 10% sare.

Din Figura 1 se observă că, în cazul pieilor experimentale, conținutul de umiditate a fost de aproximativ 70% în prima zi și a existat o scădere constantă a conținutului de umiditate de până la 40% după 21 de zile de conservare. Conținutul de umiditate al pielii este un factor decisiv, întrucât microbii precum bacteriile au nevoie de umiditate pentru a crește și supraviețui. Întrucât pieile conservate în mod tradițional cu sare au prezentat o reducere de până la 30% a conținutului de umiditate după 21 de zile de conservare, au fost raportate experiente similare efectuate cu para-clor-meta-crezol (PCMC), care prezintă o reducere de 40% a conținutului de umiditate [33]. Conservarea pe

the dual role of salt as dehydrant and bacteriostat. This shows the tenacity of the proposed less salt, phytobased preservation in dehydrating the moisture contents of the skins as low as the other methods of preservation in literature.

The soluble protein content of the experimental skins and conventional salt cured skins are depicted in Fig 2.

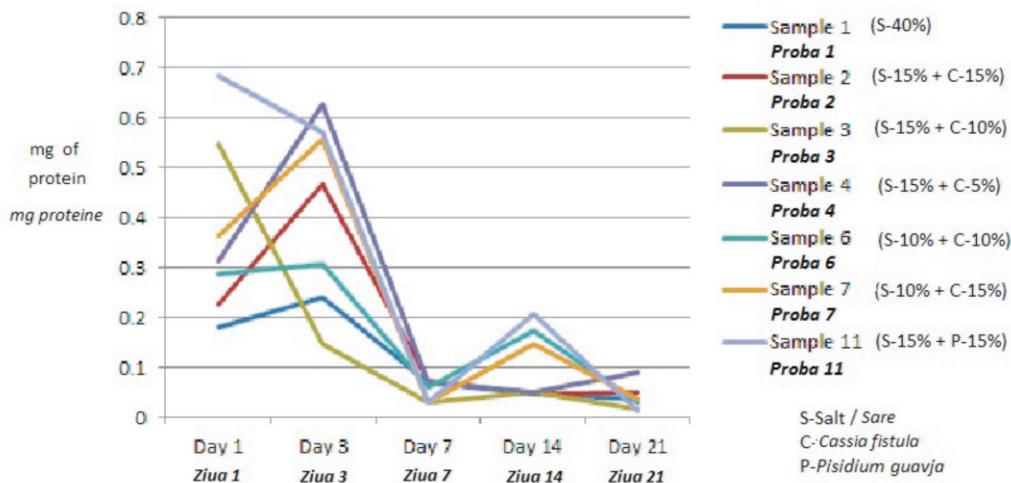


Figure 2. Determination of Soluble Protein content in phyto-preserved goat skins

Figura 2. Determinarea conținutului de proteine solubile al pieilor de capră conservate cu ajutorul plantelor

The soluble proteins in the aqueous extract of the preserved skins indicate the extent of deterioration of the skin proteins. From the results, the soluble protein levels were found to be reducing below  $0.1 \text{ mg g}^{-1}$  of the skin on the 21<sup>st</sup> day. Only the guava preserved skins with 15% leaf extract and 15 % salt showed just over  $0.2 \text{ mg g}^{-1}$  of the skin on the 14<sup>th</sup> day but it eventually reduced further on the 21<sup>st</sup> day. The Cassia fistula preserved skins showed remarkable reduction in soluble protein content by the 21<sup>st</sup> day even that being superior to Guava leaves. Thus the antimicrobial effect of both Cassia and Guava during preservation was manifested in the aqueous extracts of the preserved skins samples in a brilliant fashion.

The total content of collagen in the skin can be measured by evaluating the hydroxyproline content. Thus, by measuring the hydroxyproline content in the aqueous extracts of skins, the efficacy of preservation can be determined. The release of hydroxyproline in the aqueous extracts of the experimental skins is presented in Figure 3.

bază de sare este eficientă datorită rolului dublu al sării ca deshidratant și bacteriostatic. Acest lucru arată tenacitatea metodei de conservare propuse, pe bază de plante și cu mai puțină sare, la deshidratarea pieilor, comparabilă cu celelalte metode de conservare din literatură.

Conținutul de proteină solubilă al pieilor experimentale și al celor conservate convențional cu sare este ilustrat în Figura 2.

Proteinele solubile din extractul apăs al pieilor conservate indică gradul de deteriorare a proteinelor pielii. Din rezultate, s-a constatat reducerea nivelurilor de proteine solubile sub  $0.1 \text{ mg g}^{-1}$  în ziua 21. Doar pieile conservate cu 15% extract de frunze de guava și 15% sare au prezentat puțin peste  $0.2 \text{ mg g}^{-1}$  în ziua a 14-a, dar în cele din urmă s-a redus și mai mult în ziua 21. Pieile conservate cu *Cassia fistula* au prezentat o reducere remarcabilă a conținutului de proteină solubilă până în ziua 21, fiind superioare celor tratate cu frunze de guava. Astfel, efectul antimicrobian al extractelor de cassia și guava în timpul conservării a fost excelent în extractele apoase ale probelor de piei conservate.

Conținutul total de colagen al pieilor poate fi măsurat prin evaluarea conținutului de hidroxiprolină. Astfel, prin măsurarea conținutului de hidroxiprolină din extractele apoase ale pieilor, poate fi determinată eficacitatea conservării. Hidroxiprolina eliberată în extractele apoase ale pieilor experimentale este prezentată în Figura 3.

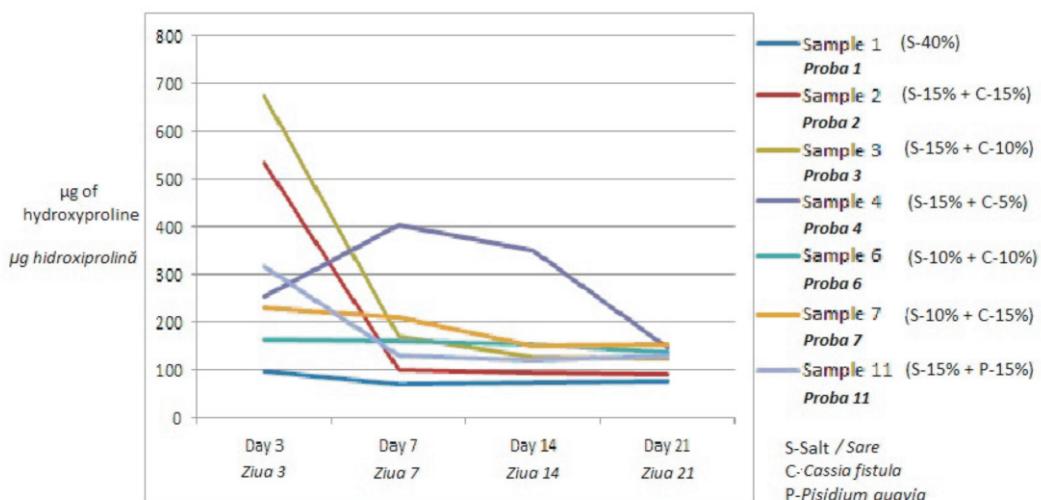


Figure 3. Determination of Soluble Hydroxyproline estimation from phyto-preserved goat skins  
Figura 3. Determinarea hidroxiprolinei solubile estimate din pieile de capră conservate cu ajutorul plantelor

The release of hydroxyproline in the aqueous extracts of skins was found to be low in all the samples (below  $500 \mu\text{g g}^{-1}$  of skin) on the 21<sup>st</sup> day, in general. The inefficacy of preservation will be indicated with the maximum hydroxyproline release in the aqueous extracts of skins. This implies also to any microbial attack or degradation of the skin by external factors. Hence, the results prove the efficacy of preservation by *Cassia fistula* and guava with the proposed less salt preservation.

În general, eliberarea de hidroxiprolină în extractele apoase ale pieilor s-a dovedit a fi scăzută în cazul tuturor probelor (sub  $500 \mu\text{g g}^{-1}$  din piele), în ziua 21. Ineficacitatea conservării va fi indicată de eliberarea maximă de hidroxiprolină în extractele apoase ale pieilor. Acest lucru este valabil, de asemenea, și pentru orice tip de atac microbian sau degradare a pielii cauzată de factori externi. Prin urmare, rezultatele dovedesc eficacitatea conservării propuse cu extracte de *Cassia fistula* și guava și mai puțină sare.

Table 4: Determination of bacterial count from skin sample  
Tabelul 4: Determinarea numărului de bacterii din probele de piei

Name of the plant <i>Denumirea plantei</i>	Sample no. Nr. probă	$10^3$ dilution CFU ml $^{-1}$ Diluție $10^3$ , CFU ml $^{-1}$				
		Day 1 Ziua 1	Day 3 Ziua 3	Day 7 Ziua 7	Day 14 Ziua 14	Day 21 Ziua 21
Control <i>Martor</i>	1	10	4	2	2	NIL*
<i>Cassia fistula</i>	2	40	8	8	8	NIL*
<i>Cassia fistula</i>	3	56	40	20	NIL*	NIL*
<i>Cassia fistula</i>	4	40	36	8	4	NIL*
<i>Cassia fistula</i>	6	8	8	4	4	NIL*
<i>Cassia fistula</i>	7	12	12	4	4	NIL*
Guava	11	64	52	24	4	NIL*

\*NIL - Zero number of colonies

\*NIL - Zero colonii

The bacterial load on samples from preserved skins is a direct indicator of putrefaction. In other words, the load indicates also the efficiency of preservation. Table 4 shows the bacterial population of control and experimental skins at different time intervals till the 21<sup>st</sup> day of preservation. The results indicate that the colonies of bacteria were reducing in the skin samples as the preservation duration increased. Ultimately, there was no growth of colonies by the 21<sup>st</sup> day because of the synergistic action of the antibacterial activity of *Cassia fistula*, *Psidium guajava* and bacteriostatic activity of salt. Thus the efficiency of preservation with cleaner phyto-preservation employed in this study stands certified.

Table 5: TDS, TS & COD in soaked liquor  
Tabelul 5: TDS, TS și CCO în lichidul de înmuiere

TDS mg l <sup>-1</sup>	TS mg l <sup>-1</sup>	COD mg l <sup>-1</sup> CCO mg l <sup>-1</sup>
21	22	288

The soak liquors were collected and tested for their TDS, TS and COD. The results showed that the TDS of the soak liquors of our phyto-based preserved skins got significant reduced. According to Springer and his colleagues [34], cost effective solutions to the TDS problem through either avoidance or end of pipe treatment are not yet forthcoming. Our preservation method is one such effort towards avoiding the TDS in the source itself. TS values using the phyto-based preservation method did not exceed the permissible TS level of 110 mg l<sup>-1</sup> is also shown in the Table 5. These solid impurities cause turbidity in the receiving streams. COD level from soaking was 288 mg l<sup>-1</sup> and was within the permissible COD level of (50-450) mg l<sup>-1</sup> [35] this indicates that the effluent is suitable to be let out into natural streams without affecting the aquatic organisms. Thus the phyto-preserved skins leave significantly lower TDS, TS and COD in the soak liquor making it a clear case of a cleaner way of preservation.

Încărcătura bacteriană a probelor de piei conservate este un indicator direct al putrefacției. Cu alte cuvinte, încărcătura bacteriană indică, de asemenea, eficiența conservării. Tabelul 4 prezintă populația bacteriană a pieilor martor și a celor experimentale la diferite intervale de timp până în ziua 21 de conservare. Rezultatele indică reducerea coloniilor de bacterii din probele de piele odată cu creșterea duratei de conservare. În cele din urmă, în ziua 21 nu s-a observat o creștere a coloniilor datorită acțiunii sinergice a activității antibacteriene a *Cassia fistula*, *Psidium guajava* și activității bacteriostatice a sării. S-a dovedit astfel eficiența metodei ecologice de conservare pe bază de plante experimentate în acest studiu.

Efluental de la înmuiere a fost colectat și testat în vederea determinării TDS, TS și CCO. Rezultatele au arătat că TDS al efluentalui de la înmuirea pieilor conservate pe bază de plante s-a redus semnificativ. Potrivit lui Springer și colab. [34], soluții ieftine pentru problema TDS fie prin evitare, fie prin depoluare la capătul liniei nu sunt încă accesibile. Metoda noastră de conservare reprezintă un astfel de efort în vederea evitării prezenței TDS. Valorile TS obținute în urma utilizării metodei de conservare pe bază de plante nu au depășit nivelul admis, de 110 mg l<sup>-1</sup>, fiind, de asemenea prezentate în Tabelul 5. Aceste impurități solide cauzează turbiditate în cursurile de apă receptoare. Nivelul CCO al lichidului de înmuire a fost de 288 mg l<sup>-1</sup>, încadrându-se în nivelul CCO admisibil (50-450) mg l<sup>-1</sup> [35], ceea ce indică faptul că este recomandat ca efluental să fie deversat în cursuri de apă naturale, fără a afecta organisme acvatice. Astfel, pieile conservate cu ajutorul plantelor duc la valori semnificativ mai mici ale TDS, TS și CCO în lichidul de înmuire, arătând în mod clar că este o metodă mai curată de conservare.

Table 6: Physical properties of control and experimental leather  
 Tabelul 6: Proprietățile fizice ale pieilor martor și cele experimentale

No. Nr. crt.	Properties <i>Proprietăți</i>	Sample 1 Control <i>Proba 1 Martor</i>	Sample 2 <i>Proba 2</i>	Sample 3 <i>Proba 3</i>	Sample 4 <i>Proba 4</i>	Sample 6 <i>Proba 6</i>	Sample 7 <i>Proba 7</i>	Sample 11 <i>Proba 11</i>
1.	Tensile strength, N mm <sup>-2</sup> <i>Rezistența la rupere, N mm<sup>-2</sup></i>							
	Along <i>În lungime</i>	20.2	18.9	22.2	23.5	21.1	13.1	13.0
	Across <i>Transversal</i>	17.1	10.1	21.1	13.2	7.2	11.1	19.4
	Elongation at break, % <i>Alungirea la rupere, %</i>							
2.	Along <i>În lungime</i>	77	68.2	55.2	56	58.5	51.7	45.2
	Across <i>Transversal</i>	67.5	39.2	71.2	83	60.0	80.3	79.8
	Tear strength, N <i>Rezistența la sfâșiere, N</i>							
	Along <i>În lungime</i>	43.3	45.6	57.1	54.4	38.7	40.6	53.2
3.	Across <i>Transversal</i>	41.0	36.6	41.9	50.6	37.2	31.3	48.5
	Thickness, mm <i>Grosime, mm</i>	0.7	0.8	0.63	0.65	0.72	0.86	0.80
	Lastometer <i>Dinamometru</i>							
	Load at grain crack, kg <i>Crăparea feței la tracțiune, kg</i>	20	23	14	16	18	17	20
4.	Distension at grain crack, mm <i>Alungire la crăparea feței, mm</i>	9.3	9.2	6.8	8.6	9.1	10.3	9.5

The physical strength properties of the experimental skins such as the tensile strength and elongation at break showed comparable results with the control and were found satisfactory (Table 6). Except for the neck portions of the leathers, tensile strength and tear load values of the experimental leathers were commensurate for upper leather. However, grain cracking property was observed to be comparable in all experimental leathers to the standards advised for upper leathers.

Proprietățile de rezistență fizică ale pieilor experimentale, cum ar fi rezistența la rupere și alungirea la rupere au prezentat rezultate comparabile cu probele martor și au fost considerate satisfăcătoare (Tabelul 6). Cu excepția porțiunilor de piele din zona gâtului, rezistența la rupere și la sfâșiere ale pieilor experimentale au fost corespunzătoare pieilor pentru fețe de încălțăminte. Cu toate acestea, proprietatea de crăpare a feței s-a constatat a fi comparabilă în cazul tuturor pieilor experimentale la standardele recomandate pentru fețe de încălțăminte.

Table 7: Total colour difference values of control and experimental leathers  
Tabelul 7: Valorile totale ale diferenței de culoare pentru piele martor și cele experimentale

Sample No. Nr. probă	L	A	B	C	H	DL
1 - Control 1 - Martor	69.790	-4.774	56.722	57.5	92.537	10.545
2	66.356	-3.22	47.808	47.916	93.888	7.111
3	69.936	-2.914	58.162	58.235	92.903	10.691
4	69.08	-4.77	49.501	49.731	95.54	78.23
5	68.96	-2.2	56.72	58.65	92.25	9.715
6	69.36	-4.13	54.48	54.64	94.37	10.12
7	71.48	-4.81	55.173	55.23	95.04	7.28

The leathers from the experimental and control skins were subjected to colour test. This test is performed to check the colour properties as some of the constituents in the plants like tannins may affect the colour of the leather during the process. The colour testing results in terms of colour and colour difference values of the control and experimental leathers are presented in Table 7. From the  $\Delta L$  and  $\Delta C$  values shown in the Table 7, it was observed that there was no major difference in the darkness value ( $\Delta L$ ) and colour intensity value ( $\Delta C$ ) between control and experimental leathers.

## CONCLUSION

In the current investigation, *Cassia fistula* and *Psidium guajava* have been selected because of their excellent antibacterial and antifungal properties. The pastes of *Cassia fistula* leaves and *Psidium guajava* leaves along with reduced salt were found to preserve freshly flayed raw goat skins for 21 days. Especially 15% paste of *Cassia fistula* leaves and 15% paste of *Psidium guajava* leaves with 15% salt (based on green weight) proved very effective Phyto-based preservation combinations. The present study suggests the use of these leaves as alternate curing agents in combination with common salt reducing TDS and COD significantly in the soak liquor. The preserved experimental skins and control (40% salt based on green weight) were processed into leathers and showed comparable

Piele finite realizate din probele de piei experimentale și martor au fost supuse testului de culoare. Acest test este efectuat pentru a verifica proprietățile de culoare, întrucât unele dintre constituenții plantelor, cum ar fi taninurile, pot afecta culoarea pielii în timpul procesului. Rezultatele testelor de culoare pentru a determina valorile diferenței de culoare ale pieilor martor și ale celor experimentale sunt prezentate în Tabelul 7. Din valorile  $\Delta L$  și  $\Delta C$  prezentate în Tabelul 7, s-a observat că nu a existat nicio diferență majoră în ceea ce privește valoarea luminozității ( $\Delta L$ ) și valoarea intensității culorii ( $\Delta C$ ) între piele martor și cele experimentale.

## CONCLUZII

În investigația de față, *Cassia fistula* și *Psidium guajava* au fost selectate datorită proprietăților lor antibacteriene și antifungice excelente. S-a constatat că paste din frunze de *Cassia fistula* și *Psidium guajava*, împreună cu o cantitate redusă de sare sunt adecvate pentru conservarea, timp de 21 de zile, a pieilor de capră crude proaspăt jupuite. În special, combinația de 15% pastă din frunze de *Cassia fistula* și 15% pastă din frunze de *Psidium guajava* cu 15% sare (în funcție de greutatea pielii crude) s-a dovedit a fi foarte eficientă pentru conservare. Studiul de față sugerează utilizarea acestor frunze ca agenți de conservare alternativi, în combinație cu sare obișnuită, ducând la reducerea semnificativă a TDS și CCO în lichidul de înmuiere. Piele experimentale și cele martor conservate (40% sare în funcție de greutatea pielii crude) au fost prelucrate până la stadiul de piele

properties which is evident from the physical testing and colour testing values. Further studies aimed at the isolation of bioactive compounds from the crude extracts are in progress to intensify the curing process as such. Thus, a new vista in curing the raw skins and hides averting pollution caused by common salt in tanneries unfurls leading to the development of a cleaner curing technology.

#### Acknowledgements

The authors thank ZERIS, a XII Five year plan network project of CSIR-CLRI for the funding supports. The authors thank Mrs. Malathy Jawahar, CSIR-CLRI, for her support in colour testing, Mr. Mohan, CSIR-CLRI, for his support in physical testing of leather samples and Dr. Ramesh Kannan, CSIR-CLRI, for his support in the initial screening of plants, and the student interns Swetha, S.K. and Surekha, K.

finită și au prezentat proprietăți comparabile, după cum reiese clar din valorile obținute la testarea proprietăților fizice și la testarea culorilor. Studii suplimentare care vizează izolarea compușilor bioactivi din extractele brute sunt în curs de desfășurare pentru a intensifica procesul de conservare. Astfel, se naște o nouă vizionă privind conservarea pieilor crude care evită poluarea cu sare în tăbăcării și care duce la dezvoltarea unei tehnologii mai curate de conservare.

#### Mulțumiri

Autorii mulțumesc proiectului ZERIS al CISR-CLRI, un proiect de rețea pe baza unui plan pe cinci ani, pentru sprijinul finanțării. Autorii mulțumesc doamnei Malathy Jawahar, CISR-CLRI, pentru sprijinul acordat la testarea culorii, domnului Mohan, CISR-CLRI, pentru sprijinul acordat la testarea fizică a probelor de piele, Dr. Ramesh Kannan, CISR-CLRI, pentru sprijinul acordat la selectarea inițială a plantelor, și studenților stagiaři Swetha, S.K. și Surekha, K.

## REFERENCES

1. Cassano, A., Molinari, R., Romano, M., Drioli, E., Treatment of aqueous effluents of the leather industry by membrane processes: A review, *J Membr Sci*, **2001**, 181, 1, 111-126.
2. Kanagaraj, J., Chandra Babu, N.K., Alternatives to Salt Curing Techniques – A Review, *J Sci Ind Res*, **2002**, 61, 339-348.
3. Hausam, W., Behaviour of hide during salting and the action on the hide protein, *J Am Leather Chem As*, **1951**, 35, 44.
4. Rajamani, S., Cleaner tanning technologies in the beam house operation, Proceedings of the Symposium on Cleaner Tanning Technologies, UNIDO, September **1998**, 2, 21-5.
5. Govindasamy, P., Madhavan, S.D., Revathi, S., Shanmugam, P., Performance Evaluation of Common Effluent Treatment Plant for Tanneries at Pallavaram CETP, *J Environ Sci Eng*, **2006**, 48, 3, 213-220.
6. Vlyssides, A.G., Israilides, C.J., Detoxification of tannery waste liquors with an electrolysis system, *Environ Poll*, **1997**, 97, 147.
7. Sadulla, S., Impact of salinity emanating from tannery environment: Leather processing to the ecosystem, in: Agro-based ecotoxicological preview on anthropogenic activities on ecosystem, Ed. Mwinyikione Mwinyihija, Nova Publishers, New York, **2015**, 59-76.
8. Haydar, S., Aziz, J.A., Characterization and treatability studies of tannery wastewater using chemically enhanced primary treatment (CEPT)--a case study of Saddiq Leather Works, *J Hazard Mater*, **2009**, 163, 2-3, 1076-83.
9. Cowan, M.M., Plant products as anti-microbial agents, *Clin Microbiol Rev*, **1999**, 12, 564–82.
10. Dahanukar, S.A., Kulkarni, R.A., Rege, N.N., Pharmacology of Medicinal Plants and Natural Products, *Indian J Pharmacol*, **2000**, 32, 81–118.
11. Vedaraman, N., Bio additive–aided skin preservation – an approach for salinity reduction, *Revista de Pielarie Incaltaminte (Leather and Footwear Journal)*, **2009**, 9, 4, 251-257.
12. Vijayalakshmi, K., Judith, R., Suseela, R., Novel plant based formulations for short term preservation of animal

- skin, *J Sci Ind Res*, **2009**, 68, 699-707.
13. Sivabalan, V., Jayanthi, J., A study to reduce salt usage in preservation of skins and hides with alternate use of plant extract, *ARP NJ of Ag Bio Sci*, **2009**, 4, 6, 43-48.
  14. Iyappan, K., Ponrasu, T., Sangeethapriya, V., Gayathri, V.S., Suguna, L., An eco-friendly method for short term preservation of skins/hides using Semecarpus anacardium nut extract, *Environ Sci Pollut Res Int*, **2013**, 20, 9, 6324-30.
  15. Danish, M., Singh, P., Mishra, G., Srivastava, S., Jha, K.K., Khosa, R.L., Cassia fistula Linn. (Amulthus)- An Important Medicinal Plant: A Review of Its Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacological Properties, *J Nat Prod Plant Resour*, **2011**, 1, 1, 101-118.
  16. Tzakou, O., Loukis, A., Said, A., Essential Oil from the Flowers and Leaves of Cassia fistula L., *J Essent Oil Res*, **2007**, 19, 4, 360-361.
  17. Mahesh, V.K., Sharma, R., Singh, R.S., Upadhyay, S.K., Anthraquinones and kaempferol from Cassia fistula species, *J Nat Prod*, **1984**, 47, 733-751.
  18. Morimoto, S., Nonaka, G., Chen, R., Tannins and related compounds, Isolation and structures of novel bi and tri flavonoids from the leaves of Cassia fistula, *Chem Pharmacol Bull*, **1988**, 36, 39-47.
  19. Gupta, A.K., Tondon, N., Sharma, M., Quality Standards of Indian Medicinal Plants, Medicinal Plants Unit, Published by Indian Council of Medical Research, **2008**, 2, 47-53.
  20. Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Soobrattee, M.A., Aruoma, O.I., Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidins, and flavonoid components in extracts of Cassia fistula, *J Agri Food Chem*, **2002**, 50, 5042-5047.
  21. Chopra, R.N., Nayar, S.L., Chpora, I.C., Glossary of Indian Medicinal Plants, National Institute of Science Communication and Information Resources, **2006**, p. 54.
  22. Perumal, R., Ignacimuthu, S., Sen, A., Screening of 34 medicinal plants antibacterial properties, *J Ethanopharm*, **1998**, 62, 173-182.
  23. Phongpaichit, S., Pujenjob, N., Rukachaisirikul, V., Ongsakul, M., Antifungal activity from the leaf extract of Cassia fistula, *J Sci Technol*, **2004**, 26, 5, 741-748.
  24. Vasudevan, D.T., Dinesh, K., Gopalakrishnan, S., Shekar, S., The potential of aqueous and isolated fraction from the leaves of Cassia fistula as an antibacterial agent, *Int J Chem Sci*, **2009**, 7, 4, 2363-2367.
  25. Okwu, D.E., Ekeke, O., Phytochemical screening and mineral composition of chewing sticks in South Eastern Nigeria, *Global J Pure Appl Sci*, **2003**, 9, 235-238.
  26. Gutiérrez, R.M., Mitchell, S., Solis, R.V., Psidium guajava: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology, *J Ethanopharm*, **2008**, 117, 1, 1-27.
  27. Trusheva, B., Trunkova, D., Bankova, V., Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study, *Chemistry Central J*, **2007**, 7, 1-13.
  28. NCCLS, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically - approved standard. **1997**. NCCLS document M7-A4. Fourth edition, Approved standard ed., Pennsylvania: NCCLS.
  29. Woessner, J.F., Jr., The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid, *Arch Biochem Biophys*, **1961**, 93, 440-447.
  30. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., Protein measurement with the folin's phenol reagent, *J Biol Chem*, **1951**, 193, 265-276.
  31. Bhalodia, N.R., Shukla, V.J., Antibacterial and antifungal activities from leaf extracts of Cassia fistula L.: An ethnomedicinal plant, *J Adv Pharm Technol Res*, **2011**, 2, 2, 104-109.
  32. Biswas, B., Rogers, K., McLaughlin, F., Daniels, D., Yadav, A., Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava (Psidium guajava L.) on Two Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria, *Int J Microbiol*, **2013**, 74, 61-65.
  33. Kanagaraj, J., Chandra Babu, N.K., Sadulla, S., Suseela Rajkumar, G., Visalakshi, V., Chandra Kumar, N., Cleaner

- techniques for the preservation of raw goat skins, *J Clean Prod*, **2001**, 9, 261-268.
34. Springer, H., John Arthur Wilson Memorial Lecture Treatment of Industrial Wastes of the Leather Industry - is it still a Major Problem, *J Am Leather Chem As*, **1994**, 89, 153–185.
35. Islam, B.I., Musa, A.E., Ibrahim, E.H., Salma, A.A.S., Elfaki, B.M., Evaluation and Characterization of Tannery Wastewater, *Journal of Forest Products & Industries*, **2014**, 3, 141-150.
- 

Article received/Data primirii articolului: 25.05.2016

Accepted/Acceptat la data: 27.06.2016