

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais**

**Encapsulamento de taninos de *Acacia mearnsii*
por métodos Sol-Gel**

Cristiane dos Santos

Dissertação de Mestrado
Porto Alegre, Novembro de 2014

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais**

**Encapsulamento de taninos de *Acacia mearnsii*
por métodos Sol-Gel**

Cristiane dos Santos

Dissertação realizada sob a orientação do Prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.

**Porto Alegre
2014**

*“A Força não provém da capacidade física,
mas da vontade férrea.”*

Mahatma Gandhi

*Ao meu marido Mark pelo apoio e amor
incondicionais e meus filhos Augusto, Anauã
e Alexandre pela motivação e inspiração.*

Agradecimentos

Ao *Prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos* pela inspiração, paciência e motivação para a realização deste trabalho, pelo seu desprendimento e comprometimento demonstrando de forma plena o verdadeiro significado da palavra orientação. Agradeço pelo bom humor nas confissões, solidariedade nos momentos de dificuldade e pelas caronas até Montenegro, afinal: "Bond, James Bond".

À Empresa Tanac S.A. por oportunizar o desenvolvimento deste trabalho fornecendo as amostras e disponibilizando seus laboratórios para os testes finais de aplicabilidade que foram possíveis pelo apoio do *Prof. Dr. Carlos R. Wolf*. Aos novos amigos *Wagner Fuck* pelos ensaios de curtimento e de solidez à luz e pelas horas de conversa pela internet, à *Tanira Aguirre* pelas dicas de Potencial Zeta, ao *Fábio Grasel* e Anderson pelos esclarecimentos sobre os processos e material de apoio.

Aos Profs. *Álvaro Vargas Jr., Nei Fronza e Sheila M. Silveira* do laboratório de microbiologia da Engenharia de Alimentos do Instituto Federal Catarinense unidade Concórdia, pelos ensaios antimicrobianos e pelo apoio recebido.

Ao grupo de trabalho formado no Laboratório de Catálise K106 onde a união, amizade e parceria primaram pelo senso de coletividade. Um ambiente típico de energia aquariana onde a criatividade e autenticidade individuais sempre estiveram presentes. Aos irmãos *Luis Fernando Brum* e *Bel Vasconcelos* pelo incentivo e parceria no início do projeto e pelas orações conjuntas. Aos amigos *Arthur o singular, William Leonardo o agitado* e *Yolice a princesa colombiana* pelo envolvimento na solução dos dados de SAXS, recursos do Origin e a presença constante nos momentos mais lúdicos. Ao *Cícero* por equilibrar (ou não) os devaneios de um grupo tão eclético e pela parceria filosófica na bancada de trabalho, infelizmente não fomos abduzidos (ainda). À *Eliana* pelo bom humor e treinamentos no TGA e pelas incontáveis conversas através do grupo durante sua ausência. À *Grasiela* pela disciplina e organização e seu jeitinho de demonstrar indignação quando alguma coisa estava errada. Aos amigos *Marcéo, Giovani* e *Willian Feltrin* pelas discussões esportivas, pela convivência e troca de experiências. À *Larissa* pela introdução aos métodos sol-gel, treinamento no Malvern e incontáveis

tutoriais do Irena. Ao César por ajudar na configuração dos programas, salvamento de pendrives destruídos e troca de conhecimento sobre taninos. Aos graduandos mais irados do IQ: *Felippe, Gislaine, Letícia e Henrique* simplesmente indispensáveis. Aos amigos mais recentes *Ariane, Marcius, Ana Paula e Nisar* que foram rapidamente inseridos na família do K106. Que todos nossos encontros, seminários, acordos e desacordos sejam sempre lembranças enriquecedoras para nossa evolução e crescimento. Às novas parceiras para os futuros artigos *Alexandra Steiner* e *Viviane Dalmoro* agradeço pelos ensaios antimicrobianos e de corrosão.

Às *Profas. Griselda Galland e Maria do Carmo Alves* pelas contribuições enriquecedoras em nossos seminários e interação em nossas reuniões de confraternização, muito obrigada.

Aos amigos do laboratório K123 *Fernanda, Cristiano e Alex* pela ajuda no BET e pela amizade.

Ao pesquisador *Mateus Borba Cardoso* do LNLS Campinas pelos ensinamentos de SAXS e Irena e pela paciência na avaliação de meus dados.

Aos professores que aceitaram compor a banca examinadora deste trabalho *Prof. Dr. Carlos Rodolfo Wolf, Prof. Dr. Johnny Ferraz Dias e Profa. Maria do Carmo Martins Alves*.

Aos meus amigos *Prof. Dr. Carlos Thomas (o conselheiro), Helen Matos e Silvana Maas* que contribuíram diretamente na execução deste trabalho me mantendo lúcida e focada, agradeço pelo incentivo e orações na grade através da orientação do *Pastor Afonso*.

Ao *Deep Purple, Johnny Winter, Pink Floyd, Red Hot Chili Peppers, Led Zeppelin e System of a down* pela presença constante em meu MP3 nos trajetos até o Vale.

Sumário

| | |
|--|------|
| Declaração de autoria | ii |
| Dedicatória | iii |
| Agradecimentos | iv |
| Sumário | vi |
| Lista de Figuras | viii |
| Lista de Tabelas | xi |
| Resumo | xii |
| Abstract | xiii |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 3 |
| 2.1 Taninos – compostos fenólicos | 3 |
| 2.2 Processo Sol-Gel | 11 |
| 3 OBJETIVO GERAL | 16 |
| 3.1 Objetivos específicos | 16 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 17 |
| 4.1 Reagentes | 17 |
| 4.2 Síntese dos Materiais Híbridos | 17 |
| 4.2.1 Síntese Sol-Gel Ácida | 18 |
| 4.2.2 Síntese Sol-Gel Básica | 19 |
| 4.2.3 Síntese Sol-Gel Silicato | 20 |
| 4.2.4 Síntese Sol-Gel Não-hidrolítica | 21 |
| 4.3 Equipamentos e Procedimentos | 22 |
| 4.3.1 Espectroscopia por Refletância difusa no UV-Vis (DRS-UV-Vis) | 22 |
| 4.3.2 Porosimetria de N ₂ | 24 |
| 4.3.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier | 24 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.3.4 | Espectrometria de Massa por Inserção direta (ID-MS) | 24 |
| 4.3.5 | Difração de Raios X (XRD) | 25 |
| 4.3.6 | Espalhamento de Raios X a baixos ângulos (SAXS) | 25 |
| 4.3.7 | Microscopia eletrônica de varredura (SEM) | 28 |
| 4.3.8 | Microscopia Confocal de varredura a Laser (CSLM) | 28 |
| 4.3.9 | Potencial Zeta | 28 |
| 4.3.10 | Análise Termogravimétrica (TGA) | 29 |
| 4.4 | Avaliação de Desempenho | 30 |
| 4.4.1 | Teor de taninos | 30 |
| 4.4.2 | Teste de lixiviação | 30 |
| 4.4.3 | Ensaio de Curtimento e Recurtimento | 30 |
| 4.4.4 | Ensaio Antimicrobianos | 31 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 33 |
| 5.1 | Caracterização dos Materiais Híbridos | 33 |
| 5.1.1 | Análise Fundamental | 33 |
| 5.1.2 | Análise Estrutural | 47 |
| 5.1.3 | Análise Textural | 67 |
| 5.1.4 | Análise Morfológica | 74 |
| 5.1.5 | Análise Térmica | 78 |
| 5.2 | Avaliação de Desempenho dos Materiais Híbridos | 81 |
| 5.2.1 | Ensaio de Curtimento e Recurtimento de couro | 81 |
| 5.2.2 | Ensaio Antimicrobianos | 87 |
| 6 | CONCLUSÕES | 90 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 91 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 1 | Figura 1 (a) Tanino Hidrolisável ⁵ (b) Tanino Condensado ⁵ (c) Unidade Catequina (posições C6 e C8) ⁵ | 4 |
| Figura 2 | Monômero de tanino condensado de <i>Acacia mearnsii</i> | 7 |
| Figura 3 | Compostos fenólicos presentes em <i>Acacia mearnsii</i> | 8 |
| Figura 4 | Esquema para obtenção dos materiais híbridos por Rota Ácida | 18 |
| Figura 5 | Esquema para obtenção dos materiais híbridos por Rota Básica | 19 |
| Figura 6 | Esquema para obtenção dos materiais híbridos por Rota Silicato | 20 |
| Figura 7 | Esquema para obtenção dos materiais híbridos por Rota não-hidrolítica | 21 |
| Figura 8 | Representação tridimensional do Sistema CIELab: L*a*b* e planos de cor a* e b* com valor de claridade (L*) constante | 23 |
| Figura 9 | Esquema geral dos ensaios de curtimento (couro piquelado) e recurtimento (couro Wet blue) | 31 |
| Figura 10 | Curvas UV-Vis obtidas de taninos por método de adição de padrão (a) Absorbância (280 nm) (b) Reflectância (280 nm) | 34 |
| Figura 11 | Curvas de calibração das rotas SGRA e SGRS pela Teoria de Kubelka- Munk | 35 |
| Figura 12 | Distribuição dos valores obtidos de L*a*b* nas diferentes rotas | 39 |
| Figura 13 | Distribuição dos valores calculados de cor (C*) e tonalidade angular (hab) para cada rota e o tanino puro | 40 |
| Figura 14 | Distribuição dos valores obtidos de ΔE^* após a síntese e decorridos seis meses ΔE^* (6m) | 42 |
| Figura 15 | Imagem de Microscopia Confocal a Laser dos Taninos puros | 43 |
| Figura 16 | Imagens de Microscopia Confocal das rotas sol-gel ácidas com aumento de 10x | 44 |
| Figura 17 | Imagens de Microscopia Confocal das rotas sol-gel básicas com aumento de 10x | 45 |

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 18 | Imagens de Microscopia Confocal das rotas sol-gel silicato com aumento de 10x | 45 |
| Figura 19 | Imagens de Microscopia Confocal de taninos puros e da rota sol-gel não hidrolítica com aumento de 10x | 46 |
| Figura 20 | Imagens de Microscopia Confocal de híbridos obtidos por SGRS3_T (taninos) e SGRS3_TC (taninos e corantes) com aumento de 40x | 47 |
| Figura 21 | (a) Espectro de FT-IR obtido do tanino não encapsulado (b) Região da impressão digital dos taninos ampliada | 49 |
| Figura 22 | Espectro de ATR obtido do tanino não encapsulado e bandas da impressão digital em destaque | 50 |
| Figura 23 | Espectro de FT-IR da amostra SGRA1_T e bandas da região da impressão digital em destaque | 51 |
| Figura 24 | Espectro de FT-IR da amostra SGRB2_T e bandas da região da impressão digital em destaque | 53 |
| Figura 25 | Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier da amostra (a)SGRS3_T e (b) Região entre 1800 cm^{-1} e 600 cm^{-1} ampliada | 54 |
| Figura 26 | Espectro de FT-IR da amostra SGRNH_T e bandas da região da impressão digital em destaque | 56 |
| Figura 27 | Diagrama esquemático dos tipos mais comuns de arranjos cíclicos primários das unidades estruturais (SiO) : (a) anel siloxano de quatro membros (SiO) ₄ e (b) anel siloxano de seis membros (SiO) ₆ | 57 |
| Figura 28 | Bandas características para as vibrações (Si-O-Si) para amostra obtida por rota ácida SGRA_BR. Espectros adquiridos com 4 cm^{-1} de resolução. LO: modo óptico longitudinal e TO: modo óptico transversal | 58 |
| Figura 29 | Deconvolução da região de estiramento (Si-O) no espectro de FTIR para a amostra SGRA1_T | 59 |
| Figura 30 | Esquema de fragmentação Retro Diels-Alder para os taninos puros e principais fragmentos detectados | 62 |
| Figura 31 | Espectro ID-MS obtido do tanino puro | 63 |
| Figura 32 | Esquema dos fragmentos identificados nos materiais híbridos (m/z 100%) e possíveis estruturas | 64 |

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 33 | Difratogramas das amostras: (a) SGRA1_T (b) SGRA4_T (c) SGRS3_T (d) SGRNH_T | 65 |
| Figura 34 | Isotermas de adsorção(●) e dessorção (●) de nitrogênio e curva de distribuição de poros (detalhe) da amostra SGRA1_T | 69 |
| Figura 35 | Isotermas de adsorção(●) e dessorção (●) de nitrogênio e curvas de distribuição de poros (detalhe) das amostras: (a) SGRS3_T (b) SGRNH_T . | 70 |
| Figura 36 | Curvas de SAXS obtidas para as amostras: (a) SGRA2_T e (b) SGRNH_T . | 73 |
| Figura 37 | Micrografias obtidas por SEM para as amostras preparadas por rota ácida (SGRA1_T, SGRA2_T, SGRA3_T e SGRA4_T) | 74 |
| Figura 38 | Micrografias obtidas por SEM para as amostras preparadas por rota básica (SGRB1_T e SGRB2_T) | 75 |
| Figura 39 | Micrografias obtidas por SEM para os taninos sem encapsulamento | 75 |
| Figura 40 | Micrografias obtidas por SEM da sílica pura e para as amostras preparadas por rota silicato (SGRS1_T, SGRS2_T e SGRS3_T) | 76 |
| Figura 41 | Micrografias obtidas por SEM para a amostra controle BR_SGRNH e do material híbrido SGRNH_T | 77 |
| Figura 42 | Termograma do tanino não encapsulado | 78 |
| Figura 43 | Curvas de perda de massa (%) x Temperatura (°C) obtidas para o tanino e amostras SGRA1_T e SGRNH_T | 80 |
| Figura 44 | Resultados curtimento couro piquelado: (a) Controle tanino (b) SGRA1_T (c) Controle curtimento/tingimento convencionais e (d) SGRA1_TC curtimento e tingimento simultâneos | 82 |
| Figura 45 | Resultados curtimento de couro piquelado (a) Controle tanino (b) SGRA3_T (c) Controle tanino e corante e (d) SGRA3_TC | 83 |
| Figura 46 | Resultados curtimento do couro piquelado: (a) Controle tanino (b) SGRS3_T | 84 |
| Figura 47 | Resultados recurtimento couro Wet blue: (a) Controle tanino (b) SGRS3_T . | 85 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|--------------------|--|----|
| Tabela I | Microorganismos suscetíveis à ação de taninos e compostos fenólicos | 9 |
| Tabela II | Equações e coeficientes de regressão linear R^2 obtidos pela técnica de adição de padrão para solução do tanino e materiais híbridos em pó | 35 |
| Tabela III | Resultados observados durante as diferentes sínteses sol-gel | 36 |
| Tabela IV | Leituras dos parâmetros CIELab para as diferentes rotas de síntese | 38 |
| Tabela V | Diferenças colorimétricas CIELab dos Materiais Híbridos e dos Taninos após seis meses | 41 |
| Tabela VI | Frequências vibracionais características (cm^{-1}) obtidas por FTIR e ATR dos taninos e dos materiais híbridos sintetizados por rota ácida | 51 |
| Tabela VII | Frequências vibracionais características (cm^{-1}) obtidas por FTIR e ATR dos taninos e dos materiais híbridos sintetizados por rota básica | 52 |
| Tabela VIII | Frequências vibracionais características (cm^{-1}) obtidas por FTIR e ATR dos taninos e dos materiais híbridos sintetizados por rota silicato | 54 |
| Tabela IX | Frequências vibracionais características (cm^{-1}) obtidas por FTIR e ATR dos taninos e dos materiais híbridos sintetizados por rota não hidrolítica | 56 |
| Tabela X | Áreas obtidas para cada contribuição através da deconvolução da banda na região compreendida entre $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ e o percentual de $(\text{SiO})_6$ encontrado para cada amostra | 60 |
| Tabela XI | Valores obtidos de Potencial Zeta, mobilidade eletroforética e condutividade dos materiais híbridos | 66 |
| Tabela XII | Análise da porosimetria de nitrogênio dos materiais híbridos e das sílicas puras | 68 |
| Tabela XIII | Raio de giro (Rg) e declividade (P) das curvas obtidas para as amostras em cada rota | 72 |
| Tabela XIV | Temperaturas (mínimas e máximas) e percentual de perda de massa dos materiais híbridos obtidos por TGA | 79 |
| Tabela XV | Índices de cor e diferença de cor total obtido por CIELab e avaliação na escala de cinza | 85 |
| Tabela XVI | Zona de inibição (mm) incluindo o diâmetro do disco das atividades dos materiais híbridos e controles | 87 |

Resumo

Neste trabalho, taninos de *Acacia mearnsii* foram encapsulados por quatro diferentes rotas de síntese sol-gel. Os materiais híbridos obtidos foram caracterizados por suas propriedades estruturais, texturais e morfológicas englobando um conjunto de técnicas. As propriedades funcionais foram testadas por ensaios de curtimento de couro piquelado, recurtimento de couro wet blue e como antimicrobiano frente a diferentes microorganismos. Os conjuntos de dados obtidos mostraram que a rota de encapsulamento afeta nitidamente as características dos materiais híbridos gerados. Os materiais híbridos que apresentaram melhor desempenho funcional foram os obtidos por rota silicato que produziram materiais mesoporosos com baixa área específica, em torno de $0,96 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, e tamanho de partículas menores que 1 nm. Estas características promoveram nos ensaios de atividade a liberação gradual dos taninos em meio aquoso e melhor interação com as proteínas do couro. Além disso, o processo demonstrou a preservação dos taninos após a síntese, maior teor de taninos encapsulados e melhor rendimento reacional. Nos ensaios funcionais, os couros obtidos com estes materiais híbridos apresentaram melhores resultados de solidez à luz após exposição à luz ultravioleta em relação aos taninos não encapsulados e, melhor atividade antimicrobiana em comparação aos demais materiais sintetizados.

Abstract

In this work, tannins from *Acacia mearnsii* were encapsulated by four different sol-gel routes. The hybrid materials were analyzed by a set of techniques aiming at their structural, textural and morphological characterization. The performance of the encapsulated materials evaluation in leather tanning, in wet blue retanning and as antimicrobial against different microorganisms. The data sets showed that the encapsulation route significantly affects the characteristics of the resulting hybrid materials. Better functional performances were obtained by silicate route that produced mesoporous materials with low surface area ($0,96 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$) and small particle size ($< 1 \text{ nm}$). These characteristics have promoted the gradual release of tannins in an aqueous medium and improved their interaction with proteins leather. Furthermore, the process demonstrated the preservation of tannins after synthesis and afforded encapsulated content. In functional assays, the skins obtained with these hybrid materials showed better results of light fastness after exposure to UV light if compared to unencapsulated free tannins and better antimicrobial activity compared to other synthesized materials.

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são matérias-primas muito importantes para diferentes indústrias, devido ao fato que apresentam em sua composição um grande número de princípios ativos, entre eles se encontram os taninos vegetais. A principal aplicação deste tipo de compostos é no curtimento natural de couros, mas, suas aplicações na agricultura ecológica, na preparação de floculantes para o tratamento de águas, na obtenção de polímeros naturais, na clarificação de vinhos e alcoóis e na síntese de produtos farmacêuticos estão motivando a indústria em fomentar o desenvolvimento deste setor econômico, ainda carente de pesquisa e tecnologia. A preocupação da indústria com a crescente discussão em torno da preservação do meio ambiente tem despertado o interesse na produção de couro livre de cromo resgatando os processos de curtimento vegetal e desenvolvendo tecnologias mais limpas.

Os taninos de *Acacia mearnsii* de Wildemann, ou Acácia negra, são extraídos da casca (20 a 30%) e as maiores plantações no Brasil são cultivadas no estado do Rio Grande do Sul. Cerca de 30 mil hectares cultivados em área própria pertencem a Empresa Tanac S.A. e 60% da produção é destinada ao mercado interno para os setores de curtumes, adesivos, petrolífero, de borrachas, etc. O restante 40% é exportado para mais de 50 países. Vale ressaltar que os únicos produtores e exportadores de tanino são a África do Sul, Brasil, Chile e China.

Polímeros naturais sempre constituíram um grupo essencial de sustentabilidade como alimento e fonte de energia. Atualmente, como recursos renováveis têm desempenhado um papel cada vez mais importante através de sua exploração de forma mais elaborada. Tecnologias associadas à fabricação de papel, têxteis, adesivos, etc. representam exemplos claros da progressiva sofisticação do bom uso desses polímeros naturais ao longo de milênios. Ao mesmo tempo, os monômeros naturais têm sido polimerizados empiricamente para aplicações como revestimentos, tintas, coagulantes / floculantes para tratamento de água e curtimento de couros.

Neste sentido, o desenvolvimento de materiais híbridos orgânico-inorgânicos por processos sol-gel possibilita agregar características específicas e desejáveis aos taninos buscando melhorar seu desempenho em relação aos processos de hidrólise e auto-oxidação nos diferentes processos.

O presente estudo foi realizado em três etapas. Inicialmente, são descritos os processos para o encapsulamento em sílica de taninos de *Acacia mearnsii* por quatro diferentes rotas de síntese sol-gel. A segunda etapa envolveu a caracterização dos materiais híbridos obtidos por diferentes técnicas envolvendo análises estruturais, texturais e morfológicas. Na última etapa foram avaliadas as funcionalidades dos materiais híbridos com a aplicação em testes de curtimento e recurtimento de couro e atividade antimicrobiana frente a diferentes microorganismos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

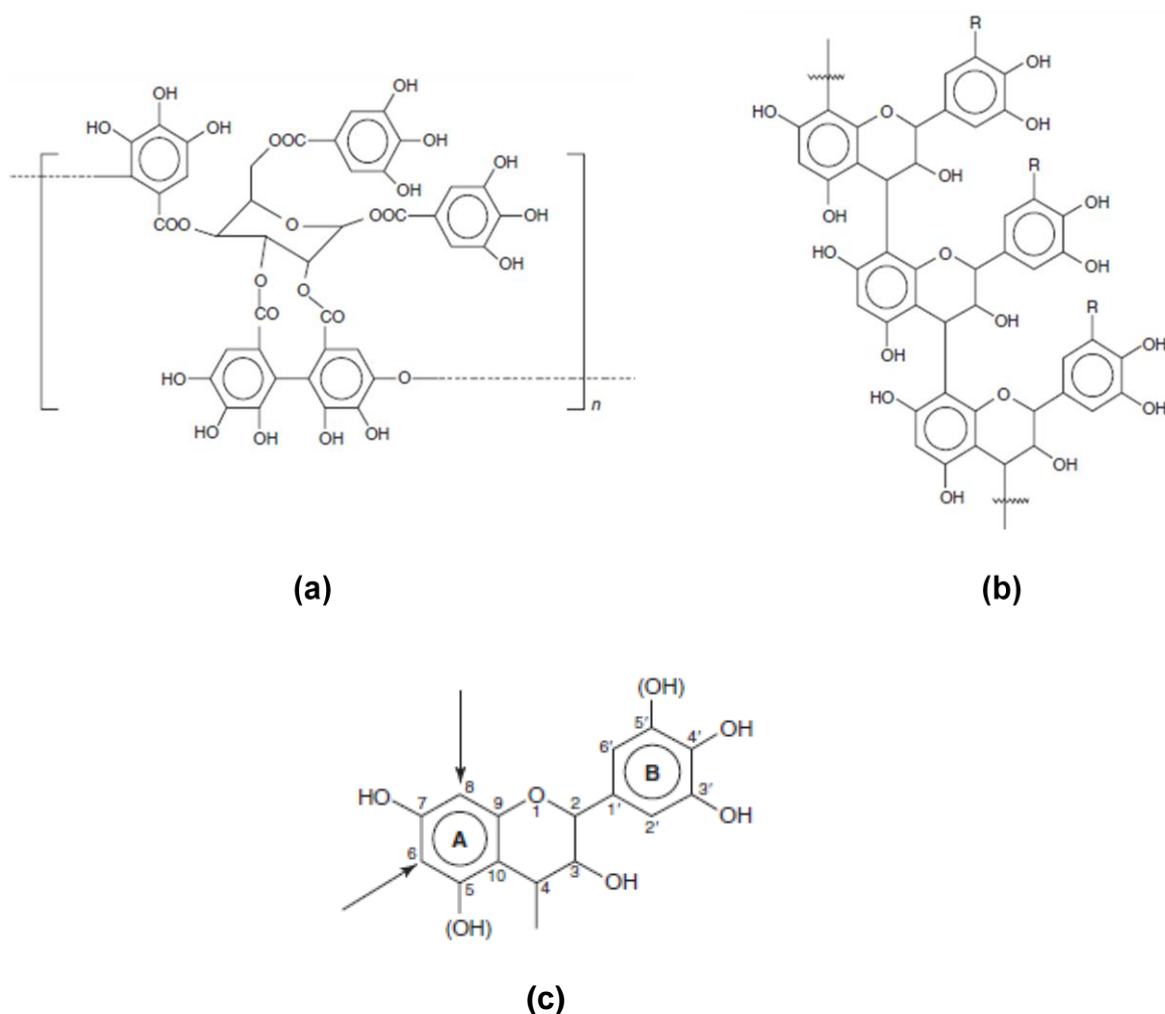
2.1 TANINOS - COMPOSTOS FENÓLICOS

Taninos são compostos fenólicos de plantas, um dos grupos mais difundido e complexo de compostos químicos no reino vegetal. Trata-se de polifenóis poliméricos constitutivos de plantas e encontrados amplamente em aniospermas e também em algumas algas verdes. Com massa molecular relativamente alta que pode variar de 500 a 3000 Da e com uma estrutura de anel aromático típica com substituintes hidroxila, estes polímeros vegetais tendem a estar relacionados com formas lenhosas de crescimento de plantas. Os taninos naturais podem ser encontrados em várias partes do vegetal, como madeira (cerne), casca, frutos e sementes. São substâncias não cristalinas, de cores que podem variar do branco ao marrom claro¹.

Uma interpretação rigorosa na definição de polifenóis considera que apenas as substâncias que carregam um número suficientemente grande de unidades di e/ou trihidroxifenólicas possam assim ser denominadas, em virtude de sua natureza oligomérica. Estes fenólicos em suas formas monoméricas enquanto permanecerem solúveis em água². A extração e purificação dos metabólitos secundários encontrados em diferentes concentrações nos diferentes órgãos da planta, que compõem polifenóis podem ser feitas com solventes, sendo os mais comuns a água, o etanol e com suas combinações³. Considerando a proporção da ocorrência de taninos em famílias das angiospermas pela classificação botânica somente 4% de 228 espécies testadas foram positivas para taninos sendo as maiores concentrações encontradas na casca de Acacia⁴.

Em plantas, dois grupos diferentes de taninos são encontrados: taninos hidrolisáveis (TH) e taninos condensados (TC). Os taninos hidrolisáveis consistem de um núcleo poliol, sendo d-glucose o mais comum, formando ésteres de ácidos gálico e elágico glicosilados, que podem sofrer clivagem hidrolítica formando ácidos fenólicos chamados de galotaninos e elagitaninos (Figura 1a). Taninos condensados

são flavonóides oligoméricos ou polímeros constituídos de unidades de catequinas (flavan-3-ol (Figura 1 c)) que são geralmente ligados através de posições C4→C8, mas as ligações C4→C6 também podem ocorrer, são também chamados de proantocianidinas pelo fato de apresentarem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, como cianidina e delphinidina (Figura 1b). Algumas espécies podem conter misturas complexas de ambos os taninos, tais como Acacia, Acer, Quercus e Bétula⁵.



**Figura 1 (a) Tanino Hidrolisável⁵ (b) Tanino Condensado⁵
(c) Unidade Catequina (posições C6 e C8)⁵**

Haslam⁶ classifica os polifenóis “verdadeiros” em três grupos: (1) proantocianidinas (PACs) ou taninos condensados derivados da oligomerização de unidades flavonóides como epicatequina, epigalocatequina e fisetinidol; (2) galotaninos e elagitaninos ou taninos hidrolisáveis derivados de ácido gálico ou de

ésteres resultantes de reações oxidativas de açúcares de polióis e (3) florotaninos que são encontrados em algas marrons e derivam do floroglucinol, a maioria utilizada na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica.

A palavra tanino é amplamente utilizada, particularmente em literatura botânica, originalmente derivada do termo “tanante”, implicando que o material vegetal produza couro a partir de peles. A maioria dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas sob a forma de ésteres ou de heterosídeos sendo, portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares. Por serem fenólicos, os taninos são muito reativos quimicamente, formam ligações de hidrogênio, intra e intermoleculares. Um mol de taninos pode ligar-se a doze moles de proteínas e, fundamentado nessa propriedade, pode-se identificar taninos por teste de precipitação de gelatinas, por exemplo. Estes compostos são facilmente oxidáveis, tanto através de enzimas vegetais específicas, quanto por influência de metais, como cloreto férrico, o que ocasiona o escurecimento de suas soluções⁷.

Os taninos condensados ou proantocianidinas são os mais utilizados na indústria principalmente para aplicações no curtimento de couro, adesivos para madeira, purificação de água, lama e aditivos para perfuração de petróleo. Os extratos de cerne do quebracho (*Schinopsis lorentzii* e *Schinopsis balansae*) e da casca da mimosa (*Acacia mearnsii*) são comercialmente as principais fontes industriais destes taninos. Estes extratos são frequentemente sulfitados através do tratamento com hidrogenosulfito de sódio para reduzir a sua viscosidade, modificar sua coloração e aumentar a sua solubilidade em água. Os taninos condensados ou polifenóis de *Acacia mearnsii*, por exemplo, podem se alterar facilmente em meio aquoso, são muito reativos e possuem a tendência de sofrer processos oxidativos a partir de sua extração e os processos de sulfitação são amplamente utilizados para o controle destes processos⁸.

Nos processos de curtimento de couro, os taninos vegetais reagem com o colagênio principalmente via ligação de hidrogênio. Este tipo de interação é inferida a partir de estudos de reação com poliamidas. Além disso, sabe-se que os polifenóis fixam-se em grupos amino das cadeias laterais do colagênio por ligações eletrostáticas com sal carboxilato ou ligação de hidrogênio com os grupos de ácido

carboxílico (dependendo do pH). Os taninos condensados têm um mecanismo adicional de reação, porque eles são mais resistentes à remoção por quebra de ligações de hidrogênio. Foi sugerido que esta interação adicional seria a reação covalente entre a proteína e o carbono aromático das moléculas do tanino através de estruturas quinoidais. Muitas vantagens são atribuídas ao uso de taninos vegetais em substituição aos sais de cromo no curtimento vegetal, principalmente relacionadas aos processos com tecnologia mais limpa⁹.

Taninos condensados oriundos de *Acacia mearnsii*, por possuírem características multifuncionais, são bastante utilizados na indústria do couro e de adesivos. A planta trazida no século passado da Austrália, justamente para a aplicação na indústria do couro, aclimatou-se muito bem na região Sul do país, onde é amplamente cultivada. O desenvolvimento de processos utilizando a casca de Acácia negra é de grande interesse por ser um recurso renovável. O extrato aquoso da casca de Acácia negra consiste aproximadamente de 75% de polifenóis, 24% de carboidratos e 1% de outros componentes como sais inorgânicos¹⁰.

Os taninos produzidos pela variedade *Acacia mearnsii* são classificados como condensados e/ou catequínicos. É um composto polifenólico que possui uma vantagem frente aos outros polifenóis naturais pela facilidade em reagir e precipitar proteínas. A predominância de trímeros é uma propriedade essencial para o curtimento de couro porque oligômeros de massa molecular elevado não são capazes de penetrar no couro, e oligômeros de baixa massa molecular seriam incapazes de reticular as proteínas nas fibras. A presença de unidades de catequina pode explicar a relativa estabilidade dos polifenóis da casca de Acácia negra durante a hidrólise ácida, a durabilidade dos produtos derivados de Acácia negra (couro e adesivos), e o espectro de fragmentação de massas muito mais simples abaixo de m/z 289, em comparação com outros polifenóis. A catequina e galocatequina são facilmente extraídas da casca de Acácia negra em comparação ao cerne do quebracho. Esta complexidade e a natureza oxigenada superior de galocatequina e robinetidinol presumivelmente reflete a primeira linha de maior proteção e das propriedades de defesa exigidos pela casca, comparado ao cerne da planta⁸.

Covington⁹ observou que os taninos condensados não sofrem hidrólise. Ao contrário, esses podem depositar-se sob forma de um precipitado gerando um

aglomerado de moléculas denominado de "vermelhos" ou flobafenos. Ao contrário dos taninos hidrolisáveis, que são relativamente resistentes à luz, os taninos condensados tendem a avermelhar acentuadamente após a exposição à luz, o que é compreensível em termos da sua estrutura de anel e capacidade de submeter-se à reticulação oxidativa. O principal monômero de Acácia negra, *Acacia mearnsii*, está ilustrado na Figura 2.

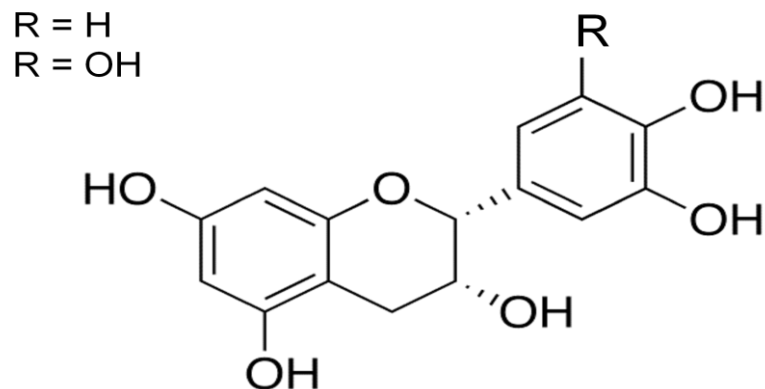


Figura 2 Monômero de tanino condensado de *Acacia mearnsii* ⁵

O grupo de substâncias fenólicas poliméricas que compõem os taninos condensados pode ser formado também a partir da polimerização de unidades de quinona (Figura 3) que podem estar envolvidas no modo de ação antimicrobiana dos taninos através da inativação de adesinas, enzimas e proteínas transportadoras que compõem o envoltório celular, aumentando a resistência de plantas a doenças. Assim, a presença deste grupo de compostos tem recebido atualmente mais atenção, pois o consumo de chás com infusão de folhas principalmente de chá verde e de vinho tinto, ricos em compostos fenólicos, poderiam curar ou prevenir uma variedade de males¹³.

A espécie de Acácia negra (*Acacia mearnsii*) reúne em sua complexa composição: catecol, benzoquinonas e o flavonóide catequina que compõem o polímero condensado ^{8, 18}. A estrutura destas subunidades ou metabólitos secundários é mostrada na Figura 3.

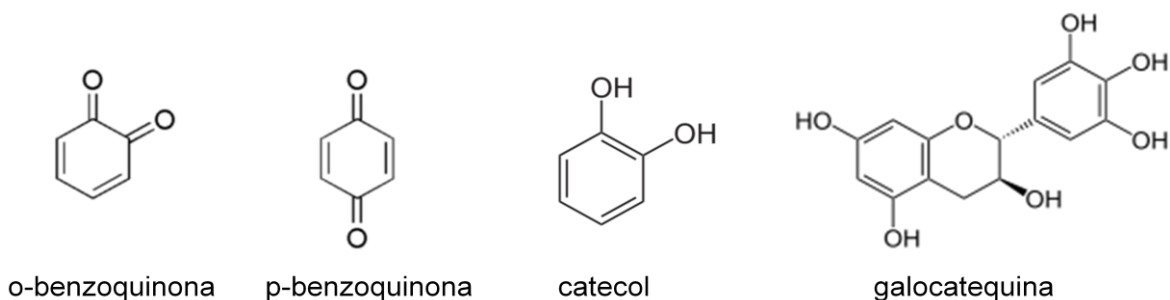


Figura 3 Espécies químicas características presentes em *Acacia mearnsii* ¹⁴

O tanino modificado de natureza catiônica atua em sistemas coloidais substituindo coagulantes químicos aplicados em tratamento de água de consumo, como por exemplo, o sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$), o sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) e o cloreto férrico (FeCl_3), neutralizando cargas e formando pontes entre essas partículas, sendo este processo responsável pela formação dos flocos e consequente sedimentação. Dentre suas propriedades, o tanino não altera o pH da água tratada, uma vez que não consome a alcalinidade do meio, ao mesmo tempo em que é efetivo em uma ampla faixa de pH, de 4,5 a 8,0. Como vantagem do uso de taninos vegetais acrescenta-se o fato de possuírem propriedade de adsorção dos metais dissolvidos na água, aglutinando-os por precipitação no meio, permitindo, dessa forma, sua remoção. Além disso, permite a eliminação ou redução da toxidez existente na água oriunda de fontes contendo cianofíceas ou bactérias clorofiladas, por exemplo. Outra vantagem é a característica biodegradável dos taninos que favorecem a recuperação de lodos e a manutenção da microbiota das estações de tratamento¹¹.

Os flavonóides, monômeros de taninos condensados, são metabólitos secundários que desempenham um papel na qualidade dos alimentos e bebidas de origem vegetal e seu consumo promove efeitos nutricionais à saúde quando consumidos. Eles estão envolvidos no desenvolvimento da cor e sabor (adstringência, amargor) dos alimentos, bem como na sua estabilidade. Uma grande parte destas propriedades surge de sua propensão a desenvolver interações físico-químicas entre si ou com outros biopolímeros ou superfícies. Os efeitos na saúde dos flavonóides estão relacionados a suas propriedades em atividades antioxidantes

(eliminação de radicais livres) e suas interações com proteínas específicas (enzimas, receptores, fatores de transcrição), que podem participar da prevenção de câncer ou doenças cardiovasculares. Quando processado em alimentos e bebidas, eles podem submeter-se a diferentes reações químicas, entre as quais as mais importantes são as reações de oxidação. Por sua vez, essas reações causam alterações estruturais (por exemplo, a recombinação de moléculas), bem como mudanças de conformação, que provavelmente modificam suas propriedades¹².

Os taninos são bastante pesquisados pelas suas propriedades como agente antimicrobiano. O caráter adstringente dos taninos pode induzir à complexação com enzimas ou substratos de origem microbiana, mas muitas outras propriedades ainda estão em estudo para definir os mecanismos da ação antimicrobiana dos taninos em diferentes microorganismos como bactérias, fungos e leveduras. Toxicidade de taninos para microorganismos é bem documentada. Estudos de toxicidade têm envolvido vários campos de pesquisa: ciência de alimentos, do solo, fitopatologia, farmacologia e de nutrição animal e humana¹³.

Na literatura são encontrados muitos estudos que avaliam as diferenças no modo de ação destes metabólitos e dos extratos puros contendo taninos condensados e hidrolisáveis em diferentes concentrações.

A Tabela I resume parte dos resultados antimicrobianos obtidos da literatura e indicam que a eficácia dos taninos de diferentes fontes vegetais (folhas, sementes e cascas) apresentam habilidade para inibição de microorganismos de diferentes origens como bactérias, fungos, leveduras e vírus.

Tabela I Microorganismos suscetíveis à ação de taninos e compostos fenólicos

| Microorganismo | Substratos | Referência |
|--|--|-------------------|
| Fungos filamentosos Leveduras Bactérias | Diferentes fontes de taninos condensados e hidrolisáveis | [13] |
| Fungos Leveduras; Vírus Bactérias (Gram+ e Gram-) | Diferentes extratos de plantas com potencial antimicrobiano | [14] |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 7644) <i>Salmonella enteritidis</i> (ATCC 13076) <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) | Efluentes agroindustriais compostos principalmente de sementes de uva e goiaba | [15] |

| | | |
|---|--|------|
| <i>Escherichia coli</i> (0157:47) <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Listeria monocytogenes</i> | Filmes incorporados com extratos de chá preto | [16] |
| <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231) <i>Candida albicans</i> (ATCC 64548) <i>Candida glabrata</i> (ATCC 90030) <i>Candida krusei</i> (ATCC 6258) <i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019) <i>Candida tropicalis</i> (ATCC 75) <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538) <i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778) <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027) | Diferentes concentrações de extratos fenólicos de <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth (Mimosaceae) | [17] |
| <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) <i>Salmonella sp.</i> (ATCC 14028) <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145) <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538) | Extratos fenólicos de casca e amêndoa de frutos de manga | [18] |

Scalber¹³ define que muitos modos de ação estão envolvidos na toxicidade de taninos para microorganismos e que as interações óbvias dos taninos com enzimas e outros substratos como ferro e componentes de membranas podem dificultar a definição exata destes mecanismos. O modo de ação e toxicidade dos taninos para microorganismos dependeria do tipo específico de microorganismo que explicaria as grandes diferenças encontradas na inibição entre fungos, bactérias e leveduras e a facilidade de adaptação de diferentes microorganismos capazes de resistir em altas concentrações de taninos de diferentes origens. Cowan¹⁴, discute em seus resultados, a complexação de taninos com a parede celular, rompimento da membrana celular, privação de substratos e inativação de enzimas como principais mecanismos de ação de polifenóis para os diferentes microorganismos testados. Em comum, os autores concordam que ocorra um sinergismo entre os diferentes metabólitos que compõem os extratos brutos para a ação antimicrobiana.

Apesar das inúmeras aplicações atribuídas aos taninos estes polímeros vegetais apresentam instabilidade físico-química em fase aquosa, sofrem reações de oxidação e auto-oxidação durante o armazenamento e conseqüentemente alterações de cor indesejáveis, principalmente quando utilizados na indústria de bebidas. Alguns exemplos na literatura relatam o uso do processo sol-gel na obtenção de suportes (sílicas) que melhoram a estabilidade de diferentes materiais.

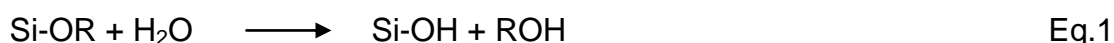
A produção de vidros bioativos de apatita para regeneração de tecidos ósseos foram obtidos por síntese sol-gel formaram estruturas únicas em microescala e elevada bioatividade em comparação aos vidros bioativos tradicionais, apresentando maior estabilidade ao pH de fluídos corporais e liberação lenta da droga sem a necessidade de adição de indutores nos testes *in vitro*¹⁹. Na área de biossensores, a imobilização de enzimas como a peroxidase, sensível e seletiva para H₂O₂ que foi imobilizada por método sol-gel na superfície de sensores de nanotubos de carbono promovendo um microambiente favorável à enzima evitando sua desnaturação formando um biossensor de terceira geração sensível e seletivo com tempo de resposta rápido, boa reprodutibilidade e estabilidade a longo prazo²⁰. Enzimas como a L-lisina usadas em aplicações industriais por serem sensíveis ao pH, temperatura e outras condições ambientais podem ser imobilizadas por método sol-gel em processos simplificados em apenas uma etapa, mantendo alta atividade enzimática e boa reprodutibilidade em dois modelos de reação: hidrólise de octilacetato em solução aquosa e acilação de feniletanol em solventes orgânicos mantendo-se estáveis²¹. Óleos essenciais de lavanda e menta foram encapsulados com ciclodextrinas por processo sol-gel para solucionar algumas desvantagens apresentadas por óleos essenciais em geral como: a instabilidade química na presença do ar, luz, em misturas e altas temperaturas. Os materiais encapsulados apresentaram grande potencial para uso na indústria de alimentos, cosméticos, farmacêuticos e na área da medicina²². A imobilização em sílica, portanto pode conferir estabilidade para diferentes condições de operação configurando o processo sol-gel como uma alternativa para a estabilização dos taninos para diferentes aplicações.

2.2 PROCESSO SOL-GEL

Sol-Gel é um processo que permite a obtenção de sólidos por gelificação sem etapas de cristalização ou precipitação. Por definição trata-se de um processo pelo qual uma rede é formada a partir de uma solução através de mudanças progressivas dos precursores líquidos em um sol, em um gel, e na maioria dos casos finalizada com uma rede seca que pode ser um polímero inorgânico ou um híbrido orgânico-inorgânico²³.

Um diferencial do método sol-gel é que ele pode ser realizado em apenas uma fase e o produto final obtido pode conter um número expressivo de grupos funcionais em comparação aos processos de adsorção utilizados na obtenção de sílicas funcionalizadas. Assim, a aplicação do método sol-gel oferece uma ampla possibilidade de desenvolvimento de materiais com intensa atividade em sua superfície através dos grupos funcionais inseridos na estrutura²⁴.

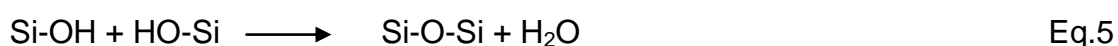
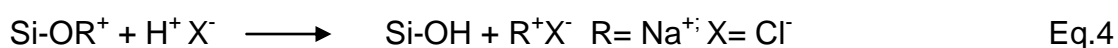
O processo baseia-se na utilização de alcóxidos de silício, no qual ocorrem reações de hidrólise e condensação por um precursor para a formação de partículas de tamanho coloidal (sol) e posterior formação da rede tridimensional (gel). O alcóxido é a base conjugada de um álcool e conseqüentemente consiste de um grupo orgânico, especificamente etila ou metila, ligados a um átomo de oxigênio negativamente carregado. Podem ser escritos como RO⁻, onde R é o substituinte orgânico. Os alcóxidos mais empregados são dos elementos silício, alumínio, zircônio e titânio. Os alcóxidos de silício apresentam uso mais intenso, cuja complexa policondensação hidrolítica leva a uma série de reações, que ocorrem simultaneamente. O mais simples uso deste alcóxido genérico, Si (OR)₄, pode ser ilustrado na síntese da sílica, SiO₂, que consiste em uma rota preparativa com controle cinético da policondensação hidrolítica em torno do átomo de silício, através da substituição dos grupos alcóxidos, pela ação nucleófila da molécula de água, para formar o correspondente álcool ROH. No complexo mecanismo forma-se, intermediariamente, o grupo siloxano (Si-O-Si), para conduzir à forma final da sílica amorfa. Assim, o precursor alcóxido passa pela sequência de oligômero, polímero, colóide, sol, e termina finalmente no sólido (rede inorgânica). As várias características do processo sol-gel (precursores metalo-orgânicos, solventes orgânicos e baixas temperaturas de processamento) permitem a introdução de moléculas orgânicas, formando um híbrido orgânico-inorgânico com características únicas. Três reações são geralmente usadas para descrever o processo sol-gel de forma geral²⁵:



onde R é um grupo etila, no caso do TEOS.

A reação de hidrólise (Eq.1)²⁵ troca grupos alcóxidos (OR) por grupos hidroxila (OH). Em seguida, as reações de condensação (Eqs. 2 e 3) que envolvem grupos silanol (Si-OH), produzem ligações siloxano (Si-O-Si) liberando os produtos álcool (ROH) (Eq.2) ou água (Eq.3)²⁵.

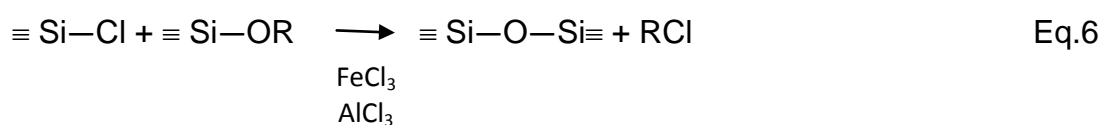
Iler²⁶ e Brinker²⁷ descrevem algumas das reações envolvidas na síntese de híbridos orgânico-inorgânicos utilizando como precursor o silicato de sódio, um sal inorgânico bastante utilizado em processos sol-gel por rota silicato (ou *water glass*). Durante a hidrólise, a espécie monomolecular Si (OH)₄ é predominante em pH 7. O processo é controlado pelo aumento do pH do meio e pela concentração de silício. Assim, espécies aniônicas e polinucleares são formadas. A temperatura durante a gelificação pode variar da temperatura ambiente até 70°C. As seguintes reações estão envolvidas no processo:



A aplicação do método de sol-gel para a síntese de materiais funcionalizados oferece um número de vantagens sobre os outros métodos. O fato é que é possível variar a natureza de ambos os agentes de formação de estrutura [E(OR)_n (E = Si, Al, etc) ou (RO)₃Si-R''- Si(OR)₃] e silanos trifuncionais (RO)₃SiR'. Nesse último caso, pode-se preparar xerogéis de polisiloxanos cuja camada de superfície contém grupos funcionais, simultaneamente, R' diferindo na sua natureza. A possibilidade de uma grande variedade de condições que são aceitáveis para efetuar a reação de policondensação hidrolítica permite um controle bastante eficiente sobre as propriedades dos produtos finais (xerogéis), principalmente quanto a sua estrutura porosa^{25,27}.

Os dois processos hidrolíticos descritos são geralmente os mais utilizados na síntese de híbridos de sílica. O primeiro método consiste na geração de espécies hidroxila a partir da hidrólise de precursores moleculares orgânico-metálicos, tais como derivados de alcóxido, na maioria das vezes em solução alcoólica e o segundo envolve a utilização de soluções aquosas de sais precursores que a partir da formação de espécies hidroxila são induzidos à policondensação pela variação do pH²⁸.

O processo não hidrolítico ocorre quando o doador de oxigênio na reação não é a água: na maioria dos casos, precursores alcóxido metálico e cloreto metálico são misturados no início da reação, ocorre uma troca de ligantes e uma redistribuição levando à formação da rede, com eliminação de um cloreto de alquila. Nestes casos, a condensação ocorre em temperatura amena (80-150°C). As taxas de reação são mais baixas em comparação às rotas hidrolíticas, principalmente quando utiliza-se o silício. Portanto, torna-se necessária a utilização de catalisadores como ácidos de Lewis (FeCl₃ ou AlCl₃) conforme ilustrado na Equação 6 ²⁹:



A versatilidade do processo não hidrolítico reside em sua potencial utilização para compostos diferenciados em meio não aquoso. O processo permite o acesso aos óxidos e um controle melhorado sobre a textura e a homogeneidade de misturas de óxidos. Em alguns casos, esta alta homogeneidade torna possível obter fases metaestáveis, quando é preferível uma ordenação de curto alcance. Além disso, processamento sol-gel não hidrolítico é muito útil para preparar materiais híbridos orgânicos-inorgânicos, especialmente os que incorporem uma parte orgânica hidrofóbica ²⁸.

O processo de formação da rede tridimensional durante o processo de condensação é influenciada diretamente pela adição de um eletrólito ou mudanças de pH; o controle de ambos os fatores pode favorecer o crescimento das partículas ou a ligação das partículas para formar cadeias. Esse processo é acompanhado por um aumento na viscosidade do meio. A estrutura do gel formado é controlada pela temperatura, pelo pH do meio, pela natureza do solvente, do eletrólito adicionado e o tipo de sal ou alcóxido utilizado. O tamanho das partículas primárias, geralmente esféricas, juntamente com a densidade e grau de aglomeração, determinam a porosidade e área específica das sílicas ³⁰. O fato da sílica ser transparente na região do espectro da luz visível, também tornou-a uma matriz interessante para a incorporação de moléculas orgânicas com propriedades ópticas ³¹.

Vários estudos têm sido realizados para examinar as propriedades da matriz porosa obtidas pelo método sol-gel, tais como a distribuição de tamanho dos poros, a área específica, a geometria do poro, morfologia e polaridade. O processo sol-gel

também permite a imobilização de biomoléculas com potencial aplicação como agentes para biorreconhecimento tais como enzimas, anticorpos e células inteiras utilizadas como biossensores e adsorventes utilizados em processos de extração em fase sólida ³².

O processo sol-gel, por sua versatilidade, pode ser moldado e adaptado ao material que se queira encapsular e muitas combinações entre precursores e catalisadores têm sido desenvolvidas na última década, tais como a combinação em uma ou duas etapas utilizando catalisadores ácidos e básicos em diferentes tempos e a variação dos precursores quando se pretende encapsular mais de um elemento na rede. Assim, as características morfológicas, texturais e elementares dos híbridos podem ser controladas conforme a aplicação final do material híbrido ²⁵.

Com relação aos taninos, ao nosso conhecimento, Copello et. al³³ desenvolveram o único trabalho envolvendo processo sol-gel, gerando uma matriz híbrida de sílica-polifenóis pelo processo sol-gel utilizando como fonte de taninos resíduos de erva mate (*Ilex paraguariensis*). A matriz obtida foi testada como um biossorvente de baixo custo na remoção de metais como Pb(II), Cr(III) e Cr(VI) presentes em efluentes residuais de curtimento sintetizados em laboratório. Os híbridos de sílica e polifenóis (taninos) foram mantidos em meio líquido e estabilizados com glutaraldeído em temperatura em torno de 5°C para evitar sua hidrólise e reações de oxidação durante os experimentos.

Alguns questionamentos surgiram a partir desta revisão bibliográfica:

- Será que o encapsulamento de taninos via sol-gel permitiria estabilizá-lo frente a potenciais reações de oxidação quando aplicados em curtimento de peles, melhorando sua estabilidade à luz?
- Seria possível ajustar condições texturais e estruturais que permitissem uma liberação controlada dos taninos em meio aquoso?
- Seria possível potencializar a ação antimicrobiana dos taninos quando encapsulados?
- Esses comportamentos seriam dependentes das rotas sol-gel aplicadas?

A partir destes questionamentos, o escopo da pesquisa da presente dissertação refere-se ao encapsulamento de taninos via processo sol-gel por diferentes rotas, com vistas à preservação das propriedades intrínsecas dos taninos.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar as potencialidades e limitações do emprego do processo sol-gel no encapsulamento de taninos de *Acacia mearnsii* com vistas à performance em processos de curtimento e recurtimento de couros e de atividade antimicrobiana.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da rota nas características elementares, estruturais, texturais e morfológicas dos materiais híbridos gerados;
- Correlacionar a natureza da rota com o desempenho e grau de curtimento e/ou recurtimento de couro;
- Analisar alterações de cor entre os materiais híbridos resultantes de oxidação e/ou auto-oxidação dos taninos e, os respectivos desempenhos de solidez à luz dos couros na luz UV;
- Comparar o efeito antimicrobiano de taninos de extratos puros de *Acacia mearnsii* e encapsulados por processo sol-gel frente a fungos, bactérias e leveduras.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

- Ácido clorídrico (HCl) PA - Dinâmica
- Água deionizada
- Álcool etílico (C₂H₅OH) PA - Merck
- Biftalato de potássio (KHC₈H₄O₄) PA – Merck
- Cloreto de alumínio anidro (AlCl₃) PA – Cromoline-Química Fina
- Cloreto de ferro III (FeCl₃) – Merck
- Corante – Carmim de Cochonilha PA Hidro 52% - Corantec Ltda.
- Corante – Índigo Carmim PA – Vetec Química Fina
- Hidróxido de amônio (NH₄OH) PA - Nuclear
- Hidróxido de sódio (NaOH) PA - Qualitec
- Metassilicato de sódio (Na₂SiO₃) PA – J.T.Baker Chemical Co.
- Tanino Weibull AQ (Tanac S.A.)
- Tetracloreto de silício (SiCl₄), 99% – Sigma-Aldrich
- Tetraetilortossilicato – TEOS (Si (OCH₂CH₃)₄), >98% - Merck

4.2 SÍNTESE DOS MATERIAIS HÍBRIDOS

Para o preparo dos materiais híbridos foram realizadas quatro rotas de síntese pelo método sol-gel com diferentes combinações de precursores de sílica e catalisadores. Os processos foram realizados ao ar, seguindo o protocolo indicado para cada rota. A maioria das reações de gelificação foi realizada em temperatura ambiente, seguindo como base as sínteses apresentadas em diferentes referências como: Handbook Sol-Gel Science and Technology Processing, Characterization and Applications, 2004 ²⁵, The Chemistry of Silica – Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry, 1979 ²⁶, Sol Gel Science – The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing, 1990 ²⁷, Studies in Surface Science and Catalysis, vol. 93, 1995 ³⁰ e Colloidal Silica: Fundamentals and Applications, 2006 ³⁴.

4.2.1 Síntese Sol-Gel Rota Ácida

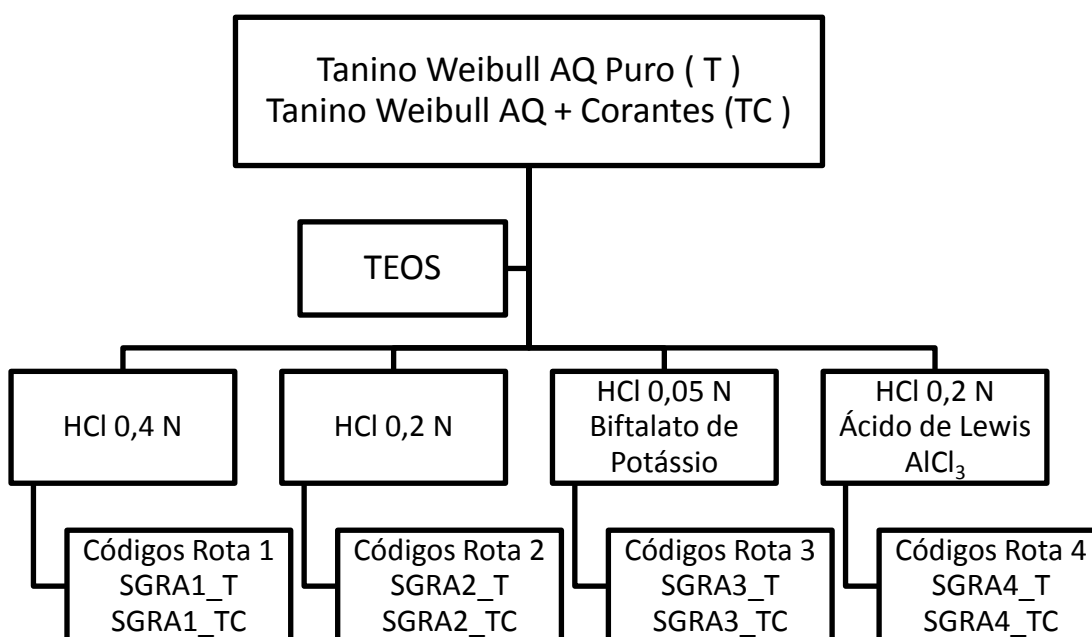


Figura 4 Esquema para obtenção dos materiais híbridos por Rota Ácida

Para a produção dos híbridos de sílica, contendo taninos e/ou corantes por catálise ácida foram realizadas quatro sínteses distintas variando-se as concentrações de ácido clorídrico (0,05; 0,2 e 0,4 N), adição de um ácido de Lewis, cloreto de alumínio (AlCl_3) na rota quatro e, um quelante orgânico, biftalato de potássio ($\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$) na rota três, modificando a síntese sugerida por Copello³³ para polifenóis. O fluxograma apresentado na Figura 4 esboça as quatro rotas realizadas e os códigos utilizados para os híbridos obtidos em cada rota. O código representa a rota sol-gel (SG) realizada, no caso, rota ácida (RA), seguido do número do procedimento correspondente, finalizado pela letra T, no caso de inclusão apenas de tanino, ou TC, no caso da combinação de tanino e corante.

Os taninos foram encapsulados por uma rota típica sol-gel misturando-se 10 mL de TEOS e 1 g de tanino em pó, dissolvidos em 5 mL de água deionizada, por 10 min. Em seguida foram adicionados 8,6 mL do catalisador HCl em concentrações que variaram entre 0,05 e 0,4 mol.L⁻¹. A rota três foi modificada com a adição de um quelante orgânico, $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ em solução 0,2 mol.L⁻¹ na diluição do tanino em pó e a temperatura foi mantida em 10°C com banho de gelo nas primeiras 6 horas de

síntese. A rota quatro foi modificada com a adição de um ácido de Lewis, AlCl_3 , na proporção de 0,3 % em peso em relação ao TEOS. A gelificação ocorreu em temperatura ambiente por um tempo médio de 48 h. Após a gelificação, as amostras secaram ao ar e em estufa a 37°C por 12 h para total eliminação de água e etanol residuais. Posteriormente, as amostras foram pulverizadas em gral de porcelana e nomeadas SGRA (Sol-Gel Rota Ácida) de 1 a 4 e T (Tanino Puro), respectivamente. As mesmas rotas foram realizadas com adição de 0,5 g de corantes orgânicos comerciais (carmim de cochonilha ou índigo carmim) para síntese de sílicas híbridas de taninos e corantes e foram identificadas por TC (Taninos e Corantes). Amostras controle foram sintetizadas para as quatro rotas sem adição do tanino e de corantes para utilização como referência nas caracterizações estruturais.

4.2.2 Síntese Sol-Gel Rota Básica

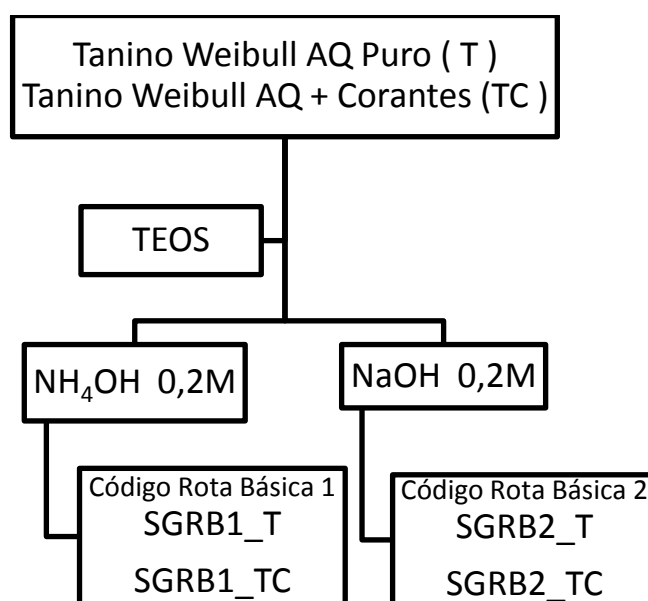


Figura 5 Esquema para obtenção dos materiais híbridos por Rota Básica

Para obtenção dos híbridos por catálise básica foram utilizados dois catalisadores: NH_4OH e NaOH , em soluções preparadas na mesma concentração de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$. Seguindo o esquema da Figura 5, em 10 mL de TEOS foi adicionado 1 g de tanino dissolvido em 5 mL de água deionizada sob agitação por 10 min. Em seguida foi adicionado 5 mL do catalisador básico (NH_4OH ou NaOH) na concentração de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e mantido sob agitação constante. A gelificação ocorreu

em temperatura ambiente, em torno de 25°C, por um tempo que variou de 24 a 48 h. As amostras secaram ao ar e em estufa a 37 °C por 12 h para total eliminação de água e etanol residuais. Posteriormente, as amostras foram pulverizadas em gral de porcelana e nomeadas SGRB (Sol-Gel Rota Básica) 1 para catalisador NH₄OH e 2 para catalisador NaOH e T (Tanino Puro). As mesmas rotas foram realizadas com adição de 0,5 g de corantes orgânicos comerciais (carmim de cochonilha ou índigo carmim) para síntese de sílicas híbridas de taninos e corantes e foram identificadas por TC (Taninos e Corantes). Amostras controle foram sintetizadas para as duas rotas sem adição do tanino e de corantes para utilização como referência nas caracterizações estruturais.

4.2.3 Síntese Sol-Gel Rota Silicato

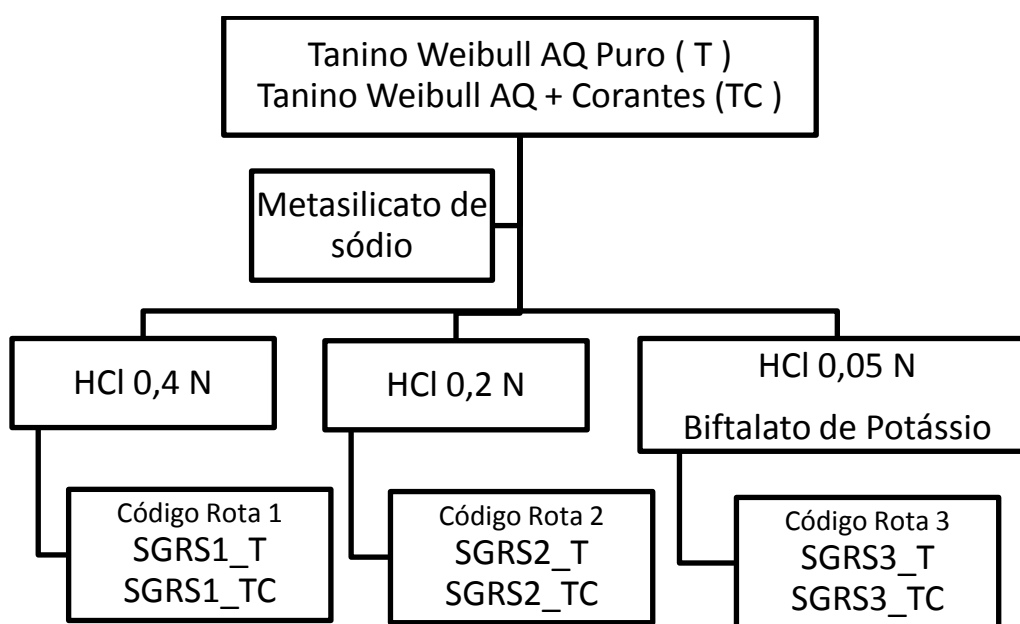


Figura 6 Esquema para obtenção dos materiais híbridos por Rota Silicato

A síntese sol-gel envolvendo silicatos foi realizada a partir da adição de 10 mL de solução de silicato de sódio concentrada (100 g.L⁻¹) e tanino em pó (1 g) diluído em 5 mL de água deionizada e catalisada por 5 mL de solução de HCl nas concentrações de 0,4 mol.L⁻¹ (rota 1) , 0,2 mol.L⁻¹ (rota 2) e 0,05 mol.L⁻¹ (rota 3), como demonstrados no esquema da Figura 6. Devido à facilidade de hidrólise dos taninos observada nas sínteses anteriores foi adicionado 20 mL de solução 0,2

mol.L⁻¹ de KHC₈H₄O₄ na rota 3. A temperatura aplicada durante a síntese foi de 50°C e o tempo total da síntese variou entre 48 e 120 h até a gelificação total. As amostras foram lavadas com água deionizada para eliminação de cloreto de sódio residual e em seguida secaram ao ar a temperatura ambiente para total eliminação de água. Posteriormente, as amostras foram pulverizadas em gral de porcelana e nomeadas SGRS (Sol-Gel Rota Silicato) 1, 2 e 3 seguidos de T (Tanino Puro). As mesmas rotas foram realizadas com adição de 0,5 g de corantes orgânicos comerciais (carmim de cochonilha ou índigo carmim) para síntese de sílicas híbridas de taninos e corantes e foram identificadas por TC (Taninos e Corantes). Amostras controle foram sintetizadas para as três rotas sem adição do tanino e de corantes para utilização como referência nas caracterizações estruturais.

4.2.4 Síntese Sol-Gel Rota Não Hidrolítica

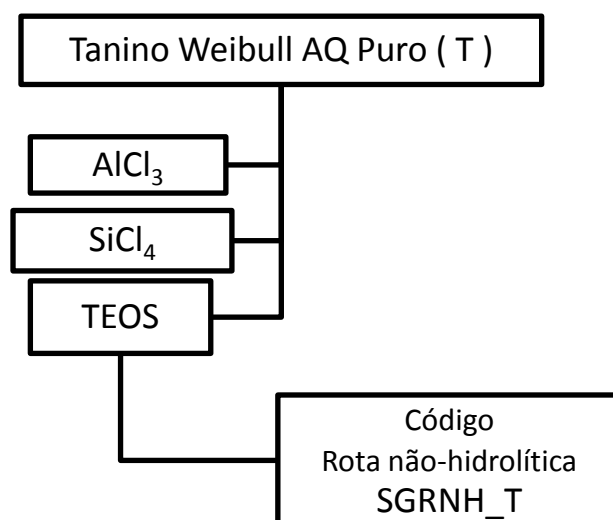


Figura 7 Esquema para obtenção dos materiais híbridos por Rota Não-hidrolítica

Para a rota não-hidrolítica, todas as reações foram realizadas sob atmosfera inerte (argônio) em frasco tipo Schlenk, seguindo os procedimentos citados por Mutin e Vioux ³⁵. Para obtenção de 2 g de taninos encapsulados, 15 mg de catalisador FeCl₃ foram adicionados juntamente com 1 g de tanino no Schlenk, seguido das adições de 3,71 mL de TEOS e 1,90 mL de SiCl₄, como esquematizado na Figura 7. A solução resultante foi mantida em frasco totalmente fechado e agitada em temperatura constante de 70 °C por cerca de 24 h até a gelificação. Após

secagem sob vácuo, o material foi pulverizado em gral de porcelana. O mesmo procedimento foi realizado para preparação do controle (branco), sem adição dos taninos. Esta rota não foi testada com a adição de corantes orgânicos.

4.3 EQUIPAMENTOS E PROCEDIMENTOS

4.3.1 Espectroscopia por Refletância Difusa no UV-VIS (DRS-UV-Vis)

Os materiais foram analisados por refletância difusa no UV-Vis em um espectrofotômetro Varian Cary 100 operando na faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm. As amostras na forma de pó foram analisadas diretamente em uma célula de quartzo de 10 mm para acessório Varian Labsphere DRA-CA-30. Esta técnica foi utilizada para construção das curvas de adição de padrão que permitiram calcular o teor de taninos encapsulados em sílica e confirmar a presença dos polifenóis e/ou subprodutos das sínteses. Amostras sem a presença de taninos foram sintetizadas nas quatro rotas e utilizadas como branco.

Para análise de cor as amostras na forma de pó foram analisadas diretamente em uma célula de quartzo de 10 mm para acessório Varian Labsphere DRA-CA-30 por refletância difusa em um espectrofotômetro Varian Cary 100 operando na faixa de comprimento de onda de 400 a 700 nm. O sistema CIE (Comissão Internacional de Iluminação) ^{36,37} é utilizado para descrever a cor e os padrões utilizados foram: fonte Iluminante (D65) e observador (2°).

Os valores de leitura obtidos são distribuídos tridimensionalmente em coordenadas colorimétricas por software específico (Cary Win UV Color[®]) que no espaço psicométrico CIELab (Figura 8) descreve a cor por luminosidade (L^*), coordenada a^* (conteúdo de vermelho (+) a verde (-)) e coordenada b^* (conteúdo de amarelo (+) a azul (-)) ou ainda pelo uso de coordenadas cilíndricas de luminosidade (L^*), tonalidade (h_{ab}) e croma (C^*). As coordenadas obtidas de cada amostra são transformadas em valores numéricos e cálculos específicos, fornecendo valores em relação às diferenças de cor de cada híbrido em relação ao material puro.

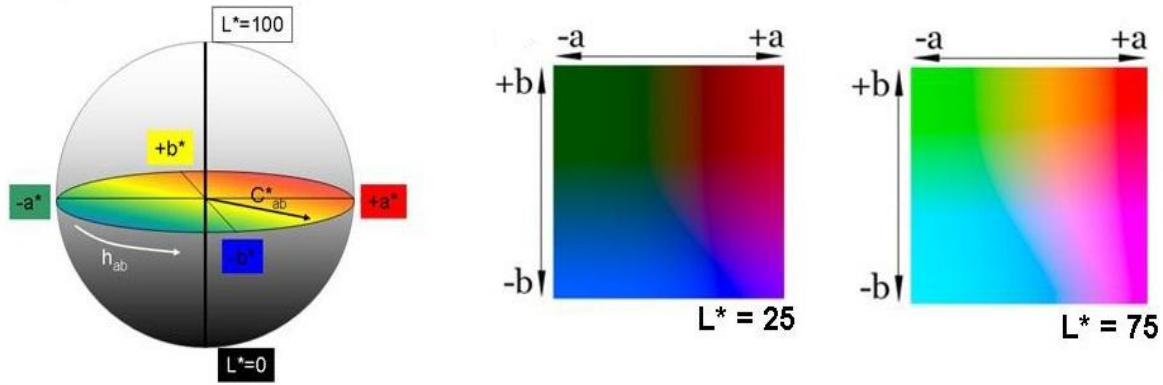


Figura 8 Representação tridimensional do Sistema CIELab: $L^*a^*b^*$ e planos de cor a^* e b^* com valor de claridade (L^*) constante^{36,37}

As equações (7) a (11) definem as coordenadas CIE L^* a^* b^* e L^* C^* ângulo Hue conforme Fairchild³⁸:

$$L^* = 116 (Y/Y_0)^{1/3} - 16 \quad (\text{luminosidade métrica}) \quad \text{Eq.7}$$

$$a^* = 500 [(X/X_0)^{1/3} - (Y/Y_0)^{1/3}] \quad (\text{eixo vermelho (+) / verde (-)}) \quad \text{Eq.8}$$

$$b^* = 200 [(Y/Y_0)^{1/3} - (Z/Z_0)^{1/3}] \quad (\text{eixo amarelo (+) / azul (-)}) \quad \text{Eq.9}$$

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad (\text{croma métrica}) \quad \text{Eq.10}$$

$$\text{Hue} = \arctan b^*/a^* \quad (\text{tonalidade métrica}) \quad \text{Eq.11}$$

Para X/X_0 , Y/Y_0 e $Z/Z_0 > 0,008856$

As diferenças entre as amostras analisadas e um padrão estabelecido são calculadas conforme as equações (12) a (17).

$$\Delta L^* = L^*_{\text{amostra}} - L^*_{\text{padrão}} \quad \text{Eq.12}$$

$$\Delta a^* = a^*_{\text{amostra}} - a^*_{\text{padrão}} \quad \text{Eq.13}$$

$$\Delta b^* = b^*_{\text{amostra}} - b^*_{\text{padrão}} \quad \text{Eq.14}$$

$$\Delta C^* = C^*_{\text{amostra}} - C^*_{\text{padrão}} \quad \text{Eq.15}$$

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad \text{Eq.16}$$

$$\Delta H^* = [(\Delta E^*)^2 - (\Delta L^*)^2 - (\Delta C^*)^2]^{1/2} \quad \text{Eq.17}$$

4.3.2 Porosimetria de N₂

As isotermas de adsorção de N₂ foram realizadas em um equipamento modelo Gemini 2375 Micromeritics. Os materiais híbridos e os taninos foram pré-tratados para desgaseificação a 110° C durante 24 h sob vácuo (10⁻² mbar). A área específica foi determinada usando o método de Brunauer-Emmett-Teller ³⁹ (BET) na T= -196°C e intervalo de 0,01<P/P_{atm}<0,35. O diâmetro médio de mesoporos e sua distribuição nos materiais híbridos foram calculados utilizando o método de Barret-Joyner-Halenda (BJH) com padrões Halsey considerando a isoterma de dessorção.

4.3.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

As análises foram realizadas em um espectrofotômetro modelo Shimadzu FTIR 8300. As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr de cerca de 2 mm de espessura e de 5 mm de diâmetro. Os espectros foram obtidos na faixa de 4000 a 400 cm⁻¹, com 32 aquisições e resolução de 4 cm⁻¹.

As amostras foram também analisadas em modo de reflectância total atenuada para análise da superfície dos materiais. As medidas foram realizadas por deposição da amostra (pó) sobre cristal de KBr também com 32 aquisições e resolução de 4 cm⁻¹.

4.3.4 Espectrometria de Massa por Inserção Direta (ID-MS)

Análise realizada em equipamento GC-MS – Shimadzu modelo QP2010S por inserção direta da amostra na unidade de massa para sólidos termolábeis. Cerca de 20 µg de amostra diluída em 1 mL de etanol foi inserida diretamente na fonte de íons, através de uma sonda, sem passar pela coluna do CG. Esta técnica é usada para compostos termicamente degradáveis ou de difícil vaporização. O equipamento não necessita nenhuma adaptação e a velocidade de varredura foi de 20000 µs a 100Hz e as amostras sofreram ionização química positiva e negativa por impacto eletrônico. Esta análise direta e rápida foi aplicada para investigação dos fragmentos de taninos encapsulados em sílica e sua preservação após a síntese. A faixa de identificação massa/carga neste tipo de equipamento varia de 1,5 a 1200 Da. As

análises foram realizadas tomando como referência os valores obtidos dos espectros dos taninos puros antes do processamento e dados obtidos da literatura.

4.3.5 Difração de Raios X (XRD)

Análises de difração de raios X foram realizadas em um Difratorômetro modelo D5000 (Siemens), utilizando um filtro de Ni e Cu-K α ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) de radiação. O tamanho médio de partícula foi calculado através da equação de Scherer (Eq.18) ⁴⁰:

$$D = K \cdot \lambda / \beta \cos \theta \quad \text{Eq. 18}$$

onde, D é o tamanho médio dos cristalitos, λ é o comprimento de onda da radiação do cobre K α (1,54 \AA), K é a constante de Scherer (K= 0,94) e β é o ângulo de difração (a intensidade mais elevada), em radianos. Os resultados obtidos por esta análise podem identificar estruturas amorfas ou semicristalinas assim como a presença de lamelas na estrutura dos híbridos. As análises foram realizadas na faixa de 2 a 30° de ângulo de difração.

4.3.6 Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos (SAXS)

Experimentos de SAXS foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil), linha de luz D11A utilizando um comprimento de onda $\lambda = 1,488 \text{ nm}$. O feixe de raios X foi selecionado por um monocromador de silício e colimado por um sistema com uma geometria do tipo *pin-hole*. O feixe incidente foi detectado em duas diferentes distâncias amostra-detector (491 e 1605 mm) para aumentar a faixa do vetor q ($q = (4\pi/\lambda)\sin\theta$; $2\theta =$ ângulo de espalhamento) coletado. As amostras secas foram dispostas entre duas fitas Kapton[®], e o feixe de raios X colimados passou através de uma câmara contendo porta amostra de aço inoxidável. Todas as medidas foram executadas à temperatura ambiente. Behenato de prata foi utilizado como padrão de calibração para a distância detector-amostra, inclinação e posição do feixe. A transmissão e correções da radiação de fundo e para as fitas Kapton[®] foram realizadas na imagem 2D antes do processamento dos dados. A média dos padrões de espalhamento isotrópicos foi realizada radialmente.

A análise de SAXS foi realizada utilizando a rotina de avaliação IRENA implementada no software Igor Pro (WaveMetrics, Portland, USA) ⁴¹. O ajuste unificado de múltiplos níveis foi utilizado para descrever um ou dois níveis de organização estrutural revelado nos dados de espalhamento ^{42,43}. Neste método, a dispersão fornecida a cada nível estrutural é a soma de uma forma exponencial de Guinier e uma cauda de lei de potência estruturalmente limitada. A equação geral que representa qualquer número de níveis pode ser escrita como na Eq. 19: ^{42,43}

$$I(q) = \sum_{i=1}^n G_i \exp\left(\frac{-q^2 R_{gi}^2}{3}\right) + B_i \exp\left(\frac{-q^2 R_{g(i+1)}^2}{3}\right) \left[\frac{(\text{erf}(qR_{gi}/\sqrt{6}))^3}{q} \right]^{P_i} \quad \text{Eq. 19}$$

onde n é o número de níveis estruturais observados, G_i é o pré-fator de Guinier, R_{gi} é o raio de giro e B_i é um fator específico para o espalhamento da lei de potência, o qual é especificado como o decaimento exponencial P . A partir destes valores define-se o tamanho, forma e distribuição fractal das partículas.

A intensidade de espalhamento é experimentalmente determinada como um vetor de espalhamento q , cujo módulo é dado pela Equação 20 ⁴⁴:

$$q = (4\pi/\lambda) \sin\theta \quad \text{Eq. 20}$$

onde, λ é o comprimento de onda da radiação incidente e θ é a metade do ângulo de espalhamento ε , formado entre as direções do feixe espalhado e transmitido.

O gráfico $I(q) \times q$ de uma amostra possui duas regiões de interesse para estudo: as regiões de Guinier e das leis de potência. A lei de Guinier é dada pela função gaussiana, que permite determinar o tamanho da partícula espalhadora, quando o sistema pode ser tomado como composto por N partículas idênticas, espalhando independentemente, em termos de raio de giro (R_g) ⁴⁵.

$$I(q) = I_0 \exp[-q^2 R_g^2 / 3] \quad \text{Eq. 21}$$

onde, I_0 é a intensidade em $q = 0$. I_0 é proporcional ao número de partículas espalhadoras em um dado volume N e R_g . A lei de Guinier é válida somente para altos valores de q , de forma que $R_g \times q < 1$. A região que pode ser analisada pelas leis de potência localiza-se a valores de q inferiores e obedece à Equação 22 ⁴⁵:

$$I(q) \sim q^{-P} \quad \text{Eq. 22}$$

onde o expoente P pode assumir valores não inteiros entre 1 e 4 e está relacionado à dimensão fractal da partícula ⁶⁵. Para sistemas complexos e randômicos, o conceito de fractal tem sido aplicado na interpretação de seus perfis de espalhamento.

A dimensão fractal D é quantificada como a massa M em um fractal mássico, ou a área A em um fractal de superfície, que mudam com a escala de comprimento que identifica o material (L). Para fractais mássicos, que podem ser descritos como estruturas poliméricas, abertas e de baixa densidade, a massa M é dada pela Equação 23 ^{44,46}:

$$M \sim L^{-D_m} \quad \text{Eq. 23}$$

em que D_m é a dimensão fractal mássica da partícula ($1 < P < 2$: estrutura caule-folha). Nesse caso, $D_m = P$. Para fractais de superfície, que podem ser descritos como núcleos densos com superfícies rugosas de área A , de acordo com a Equação 24 ^{44,46}:

$$A \sim L^{-D_s} \quad \text{Eq. 24}$$

em que D_s é a dimensão fractal de superfície ($2 < P < 4$: estrutura rugosa). Nesse caso, $P = 6 - D_s$ e assume valores nos limites $2 < P < 4$. Uma superfície

perfeitamente uniforme apresenta $D_s = 2$ e $P = 4$ (estrutura de Porod), lei de Porod, $I(q) \sim q^{-4}$.

4.3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

As micrografias foram obtidas em Microscópio JEOL - JSM 6060 operado em tensão de 20kV, gerando imagens em elétrons secundários com resolução de imagem de ponto: 3,5 nm. Uma pequena quantidade de amostra em pó foi previamente fixada em fita de carbono e metalizada com ouro (tipo *sputtering*) 24 h antes das análises e mantida em ambiente protegido de umidade e calor. As micrografias foram registradas em diferentes aumentos de 1000 a 10000x.

4.3.8 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CSLM)

Foi realizada em um microscópio Confocal Espectral Olympus FV1000, CME/UFRGS, equipado com quatro lasers de fase sólida (405, 473, 559 e 635 nm), com capacidade de fazer análises topográficas simples, por reflexão, em amostras sólidas, com aumento de 1 a 50x. As amostras (pó) foram depositadas sobre lâmina de vidro, fixadas com óleo mineral e protegidas por lamínula de vidro de 0,17 mm. As imagens foram tratadas por software do próprio equipamento FV1000.

4.3.9 Potencial Zeta

As medidas de Potencial Zeta foram realizadas em um equipamento da Malvern Instruments Ltd. Modelo Zetasizer Nano-Z, laboratório de catálise IQ/UFRGS, no qual foi inserida cerca de 50 mg da amostra pó em suspensão aquosa, oferecendo leitura em mV, que pode ser um número positivo ou negativo. O equipamento foi programado para realizar 100 corridas em três leituras por amostra e os resultados considerados a partir da média dos valores obtidos. O equipamento calcula automaticamente o Potencial Zeta a partir da mobilidade eletroforética (que

está relacionada com o ζ potencial na interface) usando a equação de Smoluchowski^{47,48}:

$$U_E = 4\pi\epsilon_0\epsilon_r \cdot \zeta / 6\pi\mu \cdot (1 + \kappa r) \quad \text{Eq. 25}$$

onde: ϵ_0 e ϵ_r são a constante dielétrica e permissividade elétrica do vácuo, respectivamente, μ é a viscosidade da solução, r o raio da partícula e $\kappa = (2n_0z^2e^2 / \epsilon_r\epsilon_0kBT)^{1/2}$ é o parâmetro de Debye-Hückel.

Sabe-se que, por diferentes mecanismos, partículas apresentam uma carga elétrica superficial: se as cargas elétricas forem de mesma natureza, aparecerá uma força elétrica de repulsão que as manterá afastadas. Caso contrário, se as partículas tiverem cargas elétricas de natureza oposta, em diferentes proporções, teremos forças elétricas de atração que farão aparecer pequenos grumos ou flocos. Pode ocorrer o adensamento desses flocos e com isso, parte da suspensão, ficará coagulada e sujeita a sedimentar no fundo do recipiente ou formar uma borra sobrenadante na superfície. Todavia, no meio aquoso, também existem cargas elétricas em razão da presença de íons que interagem eletricamente com as partículas em suspensão^{49,50}. Esta análise será importante durante os testes de desempenho dos taninos encapsulados nos ensaios em meio aquoso, nos tratamentos de couro e testes antimicrobianos.

4.3.10 Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas com equipamento TGA Q50 V 6.4 - TA Instruments, sob fluxo contínuo de nitrogênio gasoso de alta pureza, à taxa de 50 mL. min⁻¹ e taxa de aquecimento constante de 20 °C.min⁻¹. Os ensaios dinâmicos foram executados partindo da temperatura ambiente de 25 °C até 600 °C com peso médio de 11 mg (± 5 %) das amostras em pó. Através das informações obtidas, analisou-se o perfil de perda de massa dos híbridos de sílica/taninos em comparação aos taninos puros e características modificadas.

4.4 AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO

4.4.1 Teor de Taninos

O teor de taninos encapsulados em cada rota baseou-se na utilização de curvas obtidas a partir do preparo de padrões com diferentes concentrações de taninos para cada rota sintetizada. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro modelo Varian Cary 100 por refletância difusa utilizando amostras na forma de pó diretamente em uma célula de quartzo de 10 mm. As concentrações utilizadas para elaboração das curvas de calibração foram de: 100, 250, 500, 750 e 1000 mg de taninos.

4.4.2 Teste de Lixiviação

A avaliação da quantidade de taninos lixiviados em água por 24 h foi obtida pela utilização de curvas padrão com diferentes concentrações de taninos que variaram de 2 ppm a 100 ppm. Em balões de 100 mL foram adicionadas 100 mg de material encapsulado dissolvidas em 100 mL de água deionizada e coletadas alíquotas em intervalos regulares (15 min, 30 min, 1 h, 6 h, 12 h e 24 h) para leitura em espectrofotômetro modelo Varian Cary 100 em cubetas de quartzo 10 mm.

4.4.3 Ensaios de Curtimento e Recurtimento

Amostras de couro piquelado (couro depilado e descarnado) e Wet blue (couro pré-curtido ao cromo) foram curtidos e recurtidos, respectivamente, em fulão tipo Skiver nos laboratórios de Aplicação, Controle de Qualidade e Pesquisa e Desenvolvimento da Empresa Tanac S.A., seguindo roteiro padrão industrial. Os materiais foram avaliados quanto ao enchimento e atravessamento (espessura e toque) e solidez à luz seguindo orientações da ABNT NBR 14392:2013 ⁵¹. Os índices de avaliação visual pela escala de cinzas aplicados pela norma foram confirmados pelo método colorimétrico CIELab. Os experimentos foram repetidos com os materiais híbridos adicionados de corante no curtimento e recurtimento nas mesmas condições. Os ensaios seguiram um protocolo convencional para todas as amostras como descrito no esquema da Figura 9.

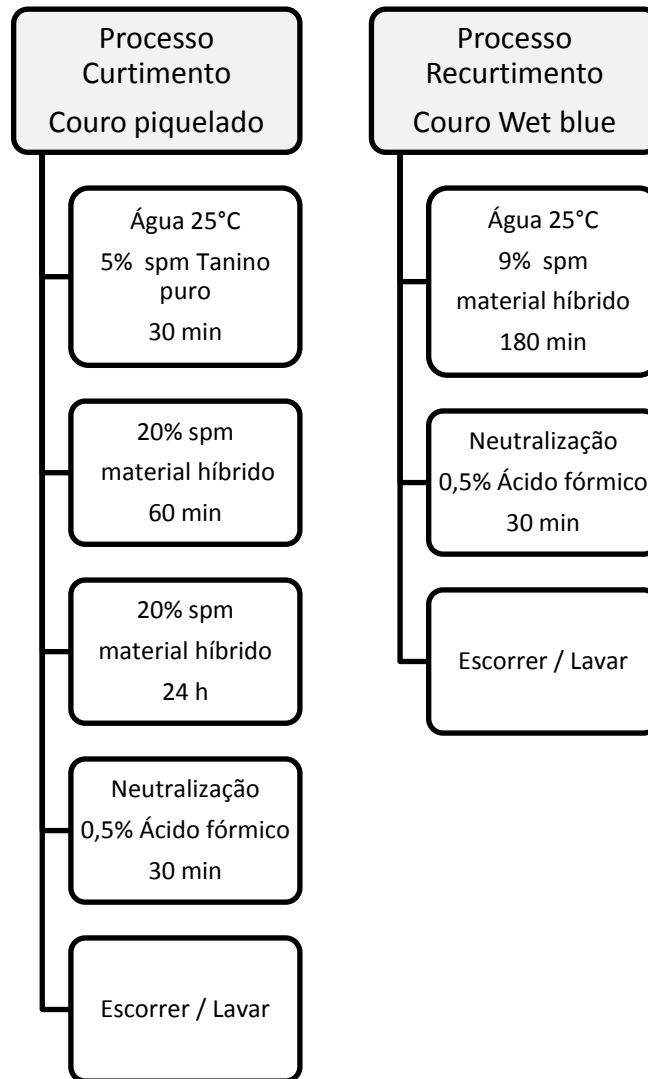


Figura 9 Esquema geral dos ensaios de curtimento (couro piquelado) e recurtimento (couro Wet blue)

Obs.: % spm: percentual sobre peso de material

4.4.4 Ensaios Antimicrobianos

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados no laboratório de microbiologia do curso de Engenharia de Alimentos no Instituto Federal Catarinense, Campus Concórdia. A detecção dos efeitos inibidores dos materiais híbridos nas bactérias testadas foi realizada usando o método de difusão de discos em ágar, pelo método CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute/ANVISA*)⁵² modificado. Foram utilizados por placa aproximadamente suspensões de bactérias na concentração de 10^6 CFU.mL⁻¹ (unidades formadoras de colônia / mL) de cada

microorganismo. O meio de cultura base utilizado nas placas para as cepas microbianas foi de ágar triptona de soja (TSA), um meio estéril à base de caseína e as culturas em suspensão foram cultivadas durante a noite a 35°C em caldo de triptona de soja (TSB), um caldo de uso geral que suporta o crescimento de uma grande variedade de microorganismos anaeróbicos, aeróbicos facultativos e fungos. As suspensões de cultura foram ajustadas para aproximadamente 10^8 CFU.mL⁻¹ em solução salina a 0,9% por comparação visual com um padrão de turbidez McFarland 0.5.

As soluções de cada antibiótico de referência e dos materiais híbridos testados, foram diluídos para 5mg.L⁻¹ em água estéril ultrapura. Discos de papel (9 milímetros de diâmetro) foram impregnados com 25 µL das amostras diluídas e colocadas no centro das placas inoculadas, as quais foram incubadas a 36°C por 24h. Os diâmetros das zonas de inibição foram medidos em milímetros. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados são referentes à média ± desvio padrão. Os graus de inibição de referência: >18 mm: forte; 14 -18 mm: moderada; 10 – 13 mm: fraca; (-) inibição não detectada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÕES DOS MATERIAIS HÍBRIDOS

Os materiais híbridos obtidos nas diferentes rotas apresentaram diferenças morfológicas e texturais importantes sendo fundamental a investigação dos efeitos das rotas utilizadas sobre a integridade, cor e atividades funcionais dos taninos após o encapsulamento.

5.1.1 Análise Fundamental

As análises elementares para a caracterização dos materiais híbridos foram realizadas por espectroscopia de refletância difusa no UV-Vis e de absorção molecular para detectar a presença, integridade e teor de taninos nas matrizes de sílica. O parâmetro de cor foi incluído para acompanhamento dos efeitos das rotas sobre a cor original dos taninos e possíveis sinais de oxidação dos polifenóis após o processo de encapsulamento. Para esta avaliação foi utilizado o software específico (*Color*) para conversão dos dados dos espectros no sistema CIELab.

O teor de taninos lixiviados em meio aquoso e a percentagem de taninos encapsulados foram obtidos a partir da elaboração de curvas de calibração e de ensaios utilizando a teoria de Kubelka-Munk pela técnica de reflectância difusa no UV-Vis⁵³.

Os padrões utilizados das soluções líquidas e dos taninos encapsulados apresentaram espectros muito semelhantes no UV-Vis com um máximo de absorbância observada em 280 nm, típico de compostos fenólicos de taninos de *Acacia mearnsii* como mostrado na Figura 10 (a) e (b). Espectros UV-Vis de taninos de acácia analisados por Kardel⁵⁴ foram utilizados como referência para a interpretação dos resultados.

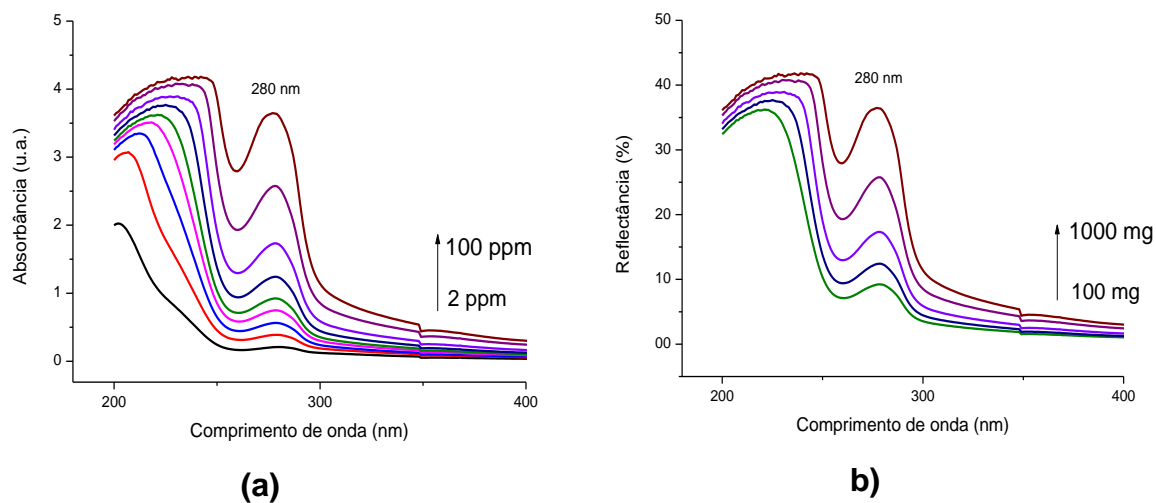


Figura 10 Curvas UV-Vis obtidas de taninos por método de adição de padrão (a) Absorbância (280 nm) (b) Refletância (280 nm)

Para a análise da lixiviação, foram preparadas soluções de taninos puros em concentrações de 2 a 100 ppm de taninos (Figura 10 (a)). A equação resultante foi utilizada para calcular a lixiviação total após 24 horas de imersão dos materiais híbridos em solução aquosa. Foram coletadas alíquotas em 15 min, 30 min, 1 h, 6 h, 12 h e 24 h para os testes de lixiviação.

As curvas de adição de padrão foram preparadas para as respectivas rotas, com a adição de 100, 250, 500, 750 e 1000 mg de tanino por grama de material híbrido obtido (Figura 10 (b)).

Os valores de refletância foram convertidos em unidades Kubelka-Munk a partir de uma função que converte unidades de refletância em unidades de absorbância similares e são obtidas a partir da seguinte Equação ⁵³:

$$(K-M) = (1 - R^2) / (2R) \quad \text{Eq. 26}$$

onde, R corresponde à medida de refletância e K-M unidades Kubelka-Munk que representam uma correlação linear com a concentração. Duas das curvas obtidas

estão demonstradas na Figura 11 para materiais híbridos obtidos pelo processo sol-gel para a rota ácida (SGRA) e silicato (SGRS).

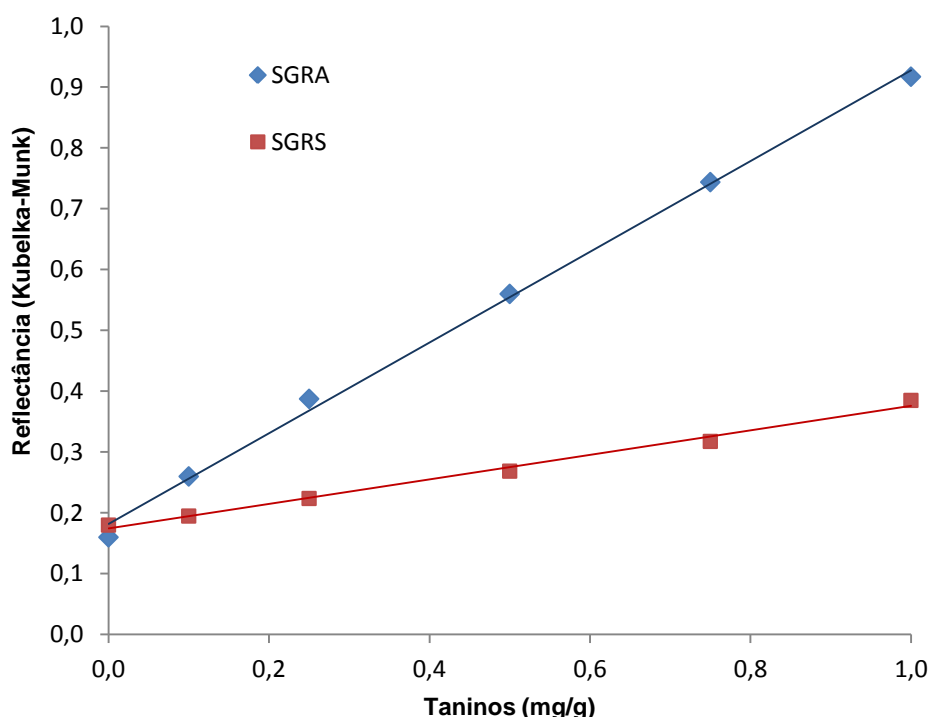


Figura 11 – Curvas de calibração das rotas SGRA e SGRS pela Teoria de Kubelka-Munk

Após três leituras para cada amostra, as curvas de calibração e suas respectivas equações lineares foram definidas e valores consistentes foram obtidos e validados por bons fatores de determinação. As equações obtidas para o tanino puro e em cada rota são apresentadas na Tabela II:

Tabela II Equações e coeficientes de regressão linear (R^2) obtidos pela técnica de adição de padrão para solução do tanino e materiais híbridos em pó

| Amostra | Equação | R^2 |
|---------|------------------------|--------|
| Tan AQ | $y = 0,0822x + 0,0618$ | 0,9985 |
| SGRA | $y = 0,7650x + 0,1659$ | 0,9924 |
| SGRB | $y = 0,5579x + 0,2054$ | 0,9876 |
| SGRS | $y = 0,2068x + 0,1704$ | 0,9927 |
| SGRNH | $y = 0,0409x + 0,0099$ | 0,9828 |

Considerando as rotas sol-gel investigadas, observou-se variações do tempo de síntese, rendimento reacional, teor de taninos encapsulados e lixiviação em meio aquoso apresentados na Tabela III para as quatro rotas.

Tabela III Resultados observados durante as diferentes sínteses sol-gel

| Síntese Sol-Gel | Tempo (h) | Rendimento (%) | Teor médio (%) | Lixiviação (%) |
|-----------------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Rota Ácida | 48 | 73 | 41 | 10 |
| Rota Básica | 48 | 60 | 55 | 10 |
| Rota Silicato | 72 - 96 | 85 | 76 | 43 |
| Rota Não-hidrolítica | 24 | 90 | 28 | < 1 |

Os valores da Tabela III são representados em percentual total de taninos, pois não foram realizadas análises quantitativas de compostos fenólicos totais dos taninos utilizados para que os resultados fossem apresentados em mg de compostos fenólicos por grama de sílica.

Pode-se observar que apesar do menor tempo de síntese, entre 24 e 48h, as rotas ácida, básica e não-hidrolítica apresentaram baixo teor de taninos encapsulados: 41, 55 e 28%, respectivamente, valores bastante inferiores em comparação com a rota silicato cujo valor foi próximo a 76%.

O rendimento total de cada rota foi relacionado ao equilíbrio estequiométrico de cada síntese e os percentuais foram calculados pela massa total de material híbrido obtido. O baixo percentual de taninos medidos em meio aquoso durante os testes de lixiviação indicam que, em temperatura ambiente, os taninos encapsulados se apresentam estáveis na rede de sílica e que a lixiviação aumenta com o aumento da temperatura até 60°C somente na rota silicato.

Na rota silicato, os taninos obtidos apresentaram em média 43% de lixiviação nas mesmas condições de temperatura ambiente por 24 horas. Com o aquecimento até 60°C foi observado um aumento gradual da concentração de tanino no meio indicando que a liberação do tanino possa ser controlada pela temperatura durante os processos de aplicação. Dos taninos encapsulados pela rota não-hidrolítica praticamente não foi observada lixiviação (<1%) indicando grande retenção dos taninos na rede de sílica. O mesmo é observado nas rotas ácidas e básicas com percentuais em torno de 10% de lixiviação durante os ensaios.

A rota silicato nesta etapa mostrou ser a rota mais eficiente no conjunto de resultados em relação ao rendimento, percentual de taninos encapsulados e teor de taninos lixiviados nos ensaios de liberação. A rota silicato também pode ser destacada por seu menor custo em relação às demais rotas.

O controle metrológico da cor foi uma ferramenta importante para avaliar a interferência e repetitividade dos processos sol-gel no encapsulamento de taninos. O valor de cor obtido para cada síntese também serve como avaliação da influência dos diferentes catalisadores e precursores sobre a cor natural dos taninos. Os compostos fenólicos são naturalmente incolores, detectados em comprimento de onda de 280 nm mas, devido à presença de diferentes pigmentos e copigmentos nos extratos de taninos puros, pode ocorrer escurecimento por oxidação na exposição à luz ou mesmo auto-oxidação dos taninos na matriz de sílica. Para avaliação de escurecimento por oxidação foram realizadas medições de cor logo após a síntese e após seis meses. Os valores obtidos foram comparados entre as duas medições também para o extrato puro.

A cor dos materiais híbridos foi determinada por meio de um espectrofotômetro Cary 100 e as medidas gravadas no sistema de cor CIE L* a* b* como descrito no item 4.3.1. O sistema L* a* b* da cor consiste de um componente de luminosidade (L*), de 0 (preto) a 100 (branco) e dois componentes cromáticos: o valor a* representa o verde (-a) para vermelho (+a), enquanto que o valor b* representa azul (-b) para amarelo (+b). Os valores do ângulo de cor (Hue ou h_{ab}) e cor total (C*) obtidos dos valores de a* e b* indicam medida de tonalidade e de cromatismo, respectivamente. O padrão utilizado para cor total foram os dados obtidos do

Tanino puro ($L^* = 41,18$; $a^* = 10,56$; $b^* = 16,29$; $C^* = 19,42$ e $h_{ab} = 57,04$). Os materiais híbridos obtidos para as quatro rotas sem adição de taninos foram utilizados como branco. O resultado apresentado envolve a média de três medições para cada amostra em dois períodos distintos: após a síntese e seis meses após o encapsulamento. Os primeiros resultados apresentados na Tabela IV mostram as leituras obtidas de cor para cada rota após a síntese.

Tabela IV Leituras dos parâmetros CIELab para as diferentes rotas de síntese

| Material Híbrido | L^* | a^* | b^* | C^* | h_{ab} | Δh_{ab} |
|------------------|---------|---------|---------|-------------|----------|-----------------|
| Tanino Puro | 41,1839 | 10,5655 | 16,2942 | 19,42 | 57,04 | - |
| SGRA1_T | 35,7177 | 6,6529 | 8,1095 | 10,49 | 50,63 | 6,41 |
| SGRA2_T | 59,3603 | 9,4560 | 16,3221 | 18,86 | 59,91 | 2,87 |
| SGRA3_T | 64,1602 | 7,5187 | 9,8521 | 12,39 | 52,65 | 4,39 |
| SGRA4_T | 30,6598 | 0,9878 | 0,7929 | 1,27 | 38,75 | 18,29 |
| SGRB1_T | 47,0671 | 1,4576 | 12,3633 | 12,45 | 83,27 | 26,23 |
| SGRB2_T | 67,5591 | 6,4288 | 10,3413 | 12,18 | 58,13 | 1,09 |
| SGRS1_T | 40,8665 | 4,3753 | 2,7012 | 5,14 | 31,69 | 25,35 |
| SGRS2_T | 76,7094 | 3,8556 | 7,6826 | 8,60 | 63,34 | 6,30 |
| SGRS3_T | 56,2627 | 4,1466 | 5,7814 | 7,11 | 54,35 | 2,69 |
| SGRNH_T | 60,3006 | 3,0371 | 3,8859 | 4,93 | 51,98 | 5,06 |

Considerando como informações mais relevantes o fator do croma (C^*) e tonalidade (h_{ab}) envolvendo os materiais híbridos na comparação aos taninos puros, observamos que, em relação a C^* as maiores variações ocorreram nas amostras: SGRA4, SGRS1, SGRS2, SGRS3 e SGRNH. As maiores variações de h_{ab} de tonalidade angular foram os híbridos das rotas: SGRB1, SGRS1, e SGRA4.

As diferenças de cor na rota SGRA4 podem estar diretamente relacionadas ao fator de pH, próximo de 2, que na presença de diferentes pigmentos e copigmentos dos taninos podem ter promovido um escurecimento nas amostras e deslocado o valor total do croma. As rotas silicato apresentaram valores de C^* bastante abaixo do padrão de referência 19,42 do tanino puro, sendo: SGRS1: 5,14; SGRS2: 8,6 e SGRS3: 7,11. O fator tempo de síntese (72 – 96 h) nas três rotas pode ter influenciado na hidrólise de pigmentos e até na decomposição de resinas presentes no tanino puro, pois os resultados demonstraram um clareamento nos materiais híbridos com o deslocamento dos valores de $L^* \cong 40$ para $L^* \cong 76$ (SGRS2) e $L^* \cong 56$ (SGRS3). Na amostra SGRS1 não observamos variação de L^* , porém

apresentaram as maiores diferenças de a^* e b^* em relação ao padrão. Os híbridos obtidos pela rota não hidrolítica (SGRNH) apresentaram a maior variação nos parâmetros L^* , a^* e b^* : a introdução de catalisadores como (FeCl_3) e a atmosfera inerte geraram materiais híbridos mais claros ($L^* \approx 60$), deslocando em 20 unidades o valor de L^* em relação aos taninos puros.

O desvio observado nos materiais híbridos SGRB1, no valor de a^* de 10,6 (tanino puro) para 1,5 confirmou uma alteração, já visível, observada de mudança da tonalidade para verde do material encapsulado. A utilização de NH_4OH como catalisador pode ter formado sub-produtos da reação em alguns anéis dos grupos hidroxifenólicos dos taninos alterando sua coloração como nas reações descritas por Braghiroli ⁵⁵. O gráfico da Figura 11 mostra a distribuição dos valores de L^* , a^* , b^* para todas as rotas em relação aos taninos puros onde podemos observar as diferenças nas leituras obtidas.

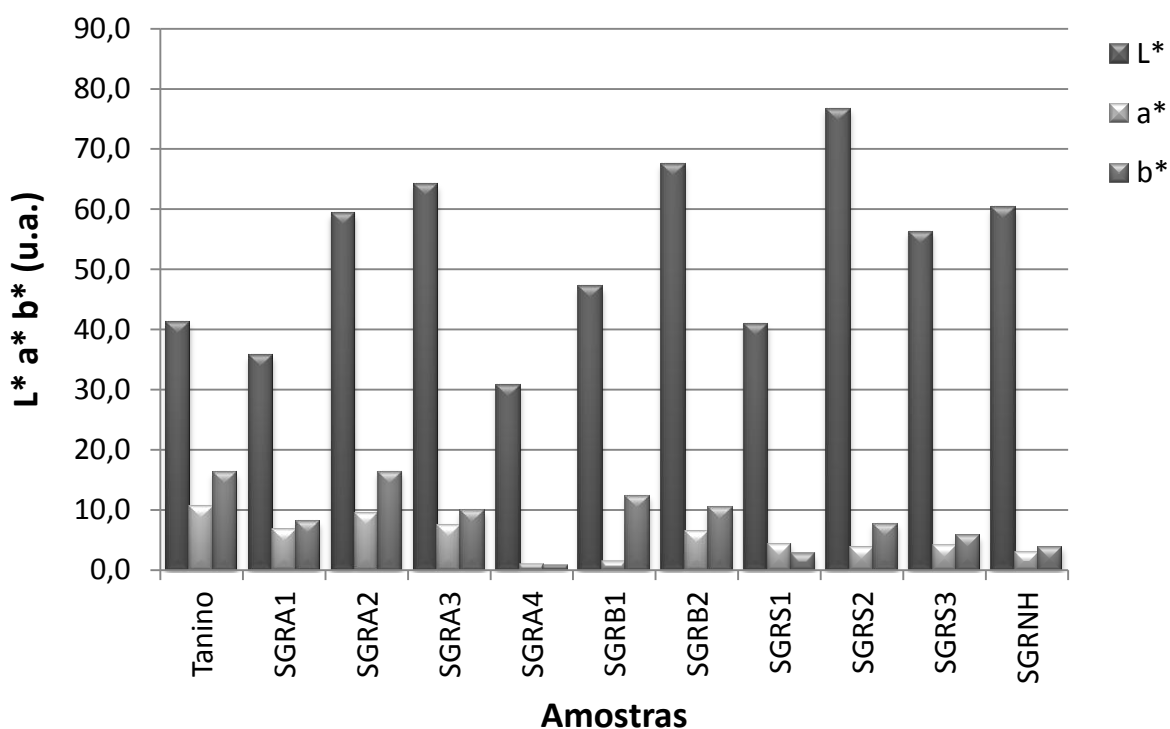


Figura 12 Distribuição dos valores obtidos de $L^*a^*b^*$ nas diferentes rotas

Considerando os valores de L^* , a^* , b^* apresentadas no gráfico da Figura 12 e os desvios no ângulo das medidas de tonalidade Δh_{ab} , entre os materiais híbridos e

o tanino puro, apresentados na Tabela IV, os materiais híbridos foram classificados em ordem de Δh_{ab} , onde os maiores valores representam os maiores desvios no ângulo de tonalidade, assim: **SGRB1 > SGRS1 > SGRA4 > SGRA1 > SGRS2 > SGRNH > SGRA3 > SGRA2 > SGRS3 > SGRB2.**

O gráfico da Figura 13 mostra a distribuição dos valores obtidos de C^* e de h_{ab} para todas as rotas.

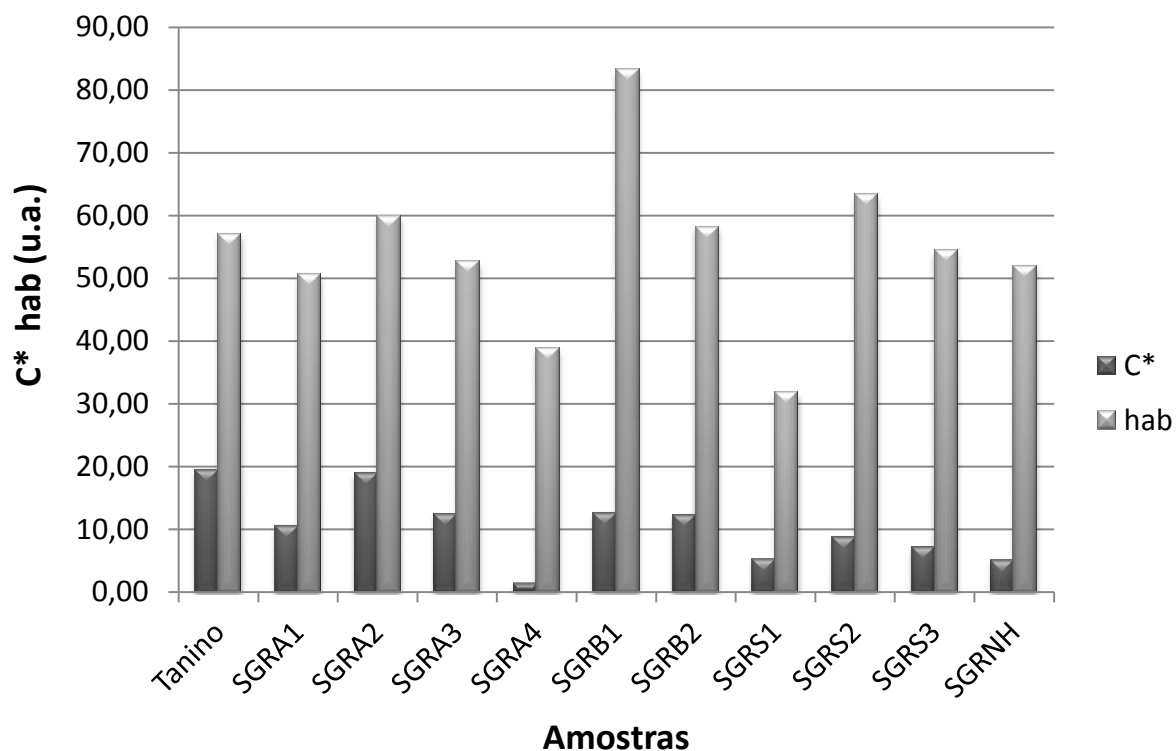


Figura 13 Distribuição dos valores calculados de cor (C^*) e tonalidade angular (h_{ab}) para cada rota e o tanino não encapsulado

Conforme discutido no item 4.3.1, os valores calculados para ΔH^* nos indicam como parâmetro colorimétrico as diferenças entre as amostras analisadas e o padrão estabelecido utilizando para isto os valores de ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔC^* e ΔE^* . Os valores obtidos da comparação entre os dados da Tabela V e as leituras realizadas após seis meses fornecem informações sobre a influência de cada rota no processo natural de oxidação (escurecimento) dos taninos com o tempo, em ambiente sem proteção da luz. O valor final de Δh_{ab} na Tabela V apresenta os valores finais obtidos nesta comparação.

Tabela V Diferenças colorimétricas CIELab dos materiais híbridos e dos taninos após seis meses

| Amostra | ΔL^* | Δa^* | Δb^* | ΔC^* | ΔE^* | ΔH^* | Δh_{ab} |
|---------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|
| Taninos | -28,24 | 0,46 | -3,06 | 2,41 | 28,41 | 1,93 | 24,48 |
| SGRA1_T | -33,21 | 0,49 | -3,17 | 2,36 | 33,36 | 2,17 | 10,71 |
| SGRA2_T | -9,74 | 0,51 | -3,19 | 2,60 | 10,26 | 1,91 | 5,44 |
| SGRA3_T | -5,02 | 0,50 | -3,19 | 2,42 | 5,96 | 2,13 | 9,04 |
| SGRA4_T | -38,41 | 0,46 | -3,14 | 2,70 | 38,54 | 1,67 | 43,66 |
| SGRB1_T | -22,22 | 0,46 | -3,17 | 3,12 | 22,45 | 0,74 | 3,14 |
| SGRB2_T | -1,78 | 0,47 | -3,13 | 2,56 | 3,64 | 1,87 | 8,02 |
| SGRS1_T | -28,37 | 0,46 | -3,10 | 1,86 | 28,54 | 2,52 | 24,28 |
| SGRS2_T | 7,14 | 0,46 | -3,16 | 2,77 | 7,82 | 1,59 | 9,26 |
| SGRS3_T | -13,16 | 0,45 | -3,09 | 2,50 | 13,52 | 1,88 | 13,03 |
| SGRNH_T | -9,15 | 0,44 | -3,03 | 2,46 | 9,65 | 1,83 | 17,47 |

Uma das vantagens do espaço de cor CIELab é que ele permite quantificar a diferença de cor entre as amostras mediante a combinação das diferenças de suas três coordenadas, tanto escalares ($L^*a^*b^*$) como cilíndricas ($L^*C^*h_{ab}$), em um espaço euclidiano, que fundamentam as fórmulas clássicas de ΔE^* e ΔH^* (Eq. 16 e 17) descritas no item 4.3.1. Os valores obtidos são capazes de indicar diferenças imperceptíveis ao olho humano e conseguem estreitar a relação entre as diferenças de cor calculada em estágios diferentes nas mesmas condições de observação⁵⁶.

Os valores obtidos de ΔL^* e ΔE^* e a análise visual das amostras indicaram grande modificação tanto dos taninos puros quanto dos materiais híbridos. Porém, as diferenças entre as amostras nos permite uma classificação numérica de desempenho quanto às modificações de cor. Da Tabela V, os valores negativos de ΔL^* mostram um escurecimento de todas as amostras (deslocamento no sentido de $L=0$, mais escuro ou preto), com exceção da amostra de SGRS2 com valor positivo (7,14), indicando um clareamento da amostra. Comparando o escurecimento das amostras em relação aos taninos puros ($\Delta L^* = -28,24$), os piores desempenhos após seis meses seguem a ordem decrescente: SGRA4 (-38,41), SGRA1 (-33,21), SGRS1 (-28,37). As amostras: SGRB1 (-22,22), SGRS3 (-13,16), SGRA2 (-9,74), SGRNH (-9,15), SGRA3 (-5,02) e SGRB2 (-1,78) apresentaram melhores resultados que o tanino puro indicando maior estabilidade que os taninos puros.

Considerando as diferenças calculadas para Δa^* e Δb^* que interferem diretamente no croma, observamos um aumento do valor de a^* (valores positivos) em todas as amostras indicando um aumento na tonalidade do vermelho. Na

coordenada b^* , os valores negativos para todas as amostras indicam um aumento de azul e declínio do amarelo. Assim, a contribuição de Δa^* e Δb^* indicam um acastanhamento das amostras em proporções muito próximas. Os valores obtidos de ΔC^* (variação de cor) são considerados pequenos, variando de 1,86 a 3,12. Em avaliações colorimétricas, os valores de $\Delta C^* \leq 1$ são imperceptíveis ao olho humano.

Os valores de ΔE^* que indicam a diferença de cor total entre as duas leituras foi bastante significativa para todas as amostras: quanto maior o valor da diferença, maior alteração em relação ao tanino puro. Considerando como referência o valor obtido para os taninos puros: $\Delta E^* = 28,41$, as maiores diferenças foram para as amostras: SGRA4 (38,54), SGRA1 (33,36), SGRS1 (28,54) e SGRB1 (22,45), conforme mostrados no gráfico da Figura 14. Na sequência, em ordem decrescente, podemos classificar: SGRS3 (13,52), SGRA2 (10,26), SGRNH (9,65), SGRS2 (7,82), SGRA3 (5,96) e SGRB2 (3,64), com melhores desempenhos que o tanino puro.

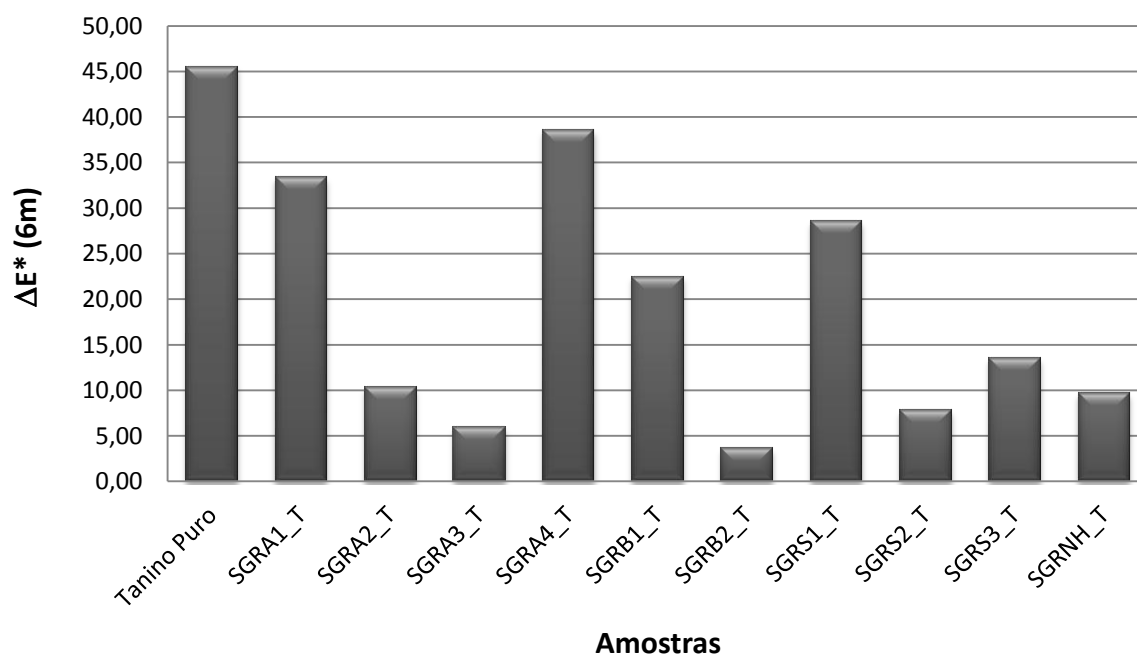


Figura 14 Distribuição dos valores obtidos de ΔE^* após a síntese e decorridos seis meses $\Delta E^* (6m)$

Com relação às variações no ângulo de tonalidade do eixo hue (h_{ab}), o maior desvio observado foi na rota SGRA4 (43,66) seguida das rotas SGRS1 (24,28) e SGRNH (17,47). Assim, podemos concluir ao final de toda avaliação colorimétrica que as amostras: **SGRA4, SGRA1, SGRS1 e SGRB1** obtiveram a pior avaliação em

relação aos taninos puros, mostrando uma interferência direta das rotas sobre as características de cor naturais dos taninos. Em contrapartida, observamos uma redução no escurecimento (oxidação) dos compostos fenólicos nas amostras: **SGRB2, SGRA3, SGRS2, SGRA2, SGRS3 e SGRNH**.

Análises por Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CSLM) foram realizadas observando a topografia das amostras e a distribuição dos taninos que, foi verificada após varredura em 559 nm e comparadas às imagens obtidas do tanino puro da Figura 15. Verificamos que os taninos apresentaram fluorescência de maneira uniforme por toda amostra e apresentaram uma topografia própria típica de materiais secos por *spray drying*, onde o produto de secagem apresenta o mesmo tamanho e forma da gotícula que a originou podendo formar esferas intactas, sólidas ou ocas, como nos taninos apresentados ⁵⁸.

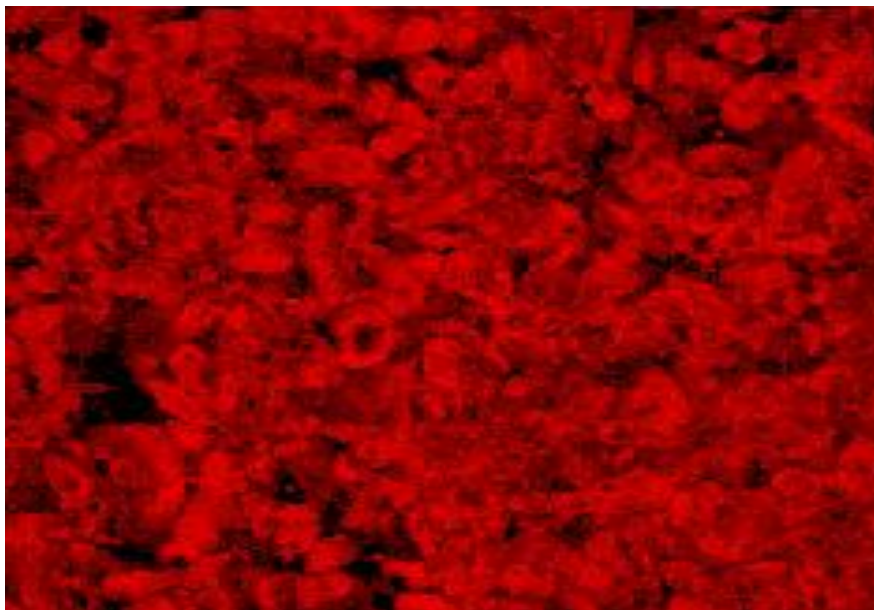
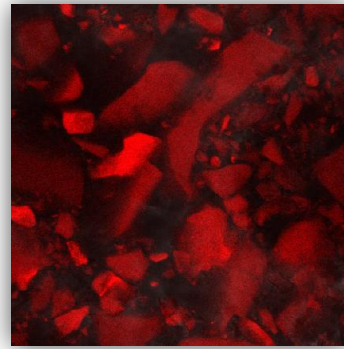


Figura 15 Imagem de Microscopia Confocal a Laser dos Taninos puros

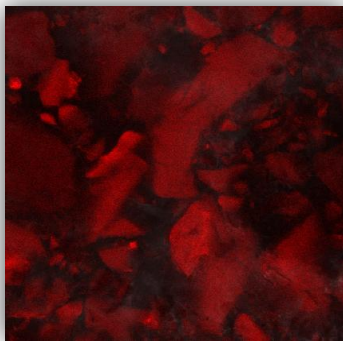
Na Figura 16 são apresentadas as imagens obtidas por microscopia confocal dos materiais híbridos obtidos nas quatro rotas por catálise ácida, SGRA1, SGRA2, SGRA3 e SGRA4, onde se visualiza a diferença na distribuição dos taninos nas quatro rotas.



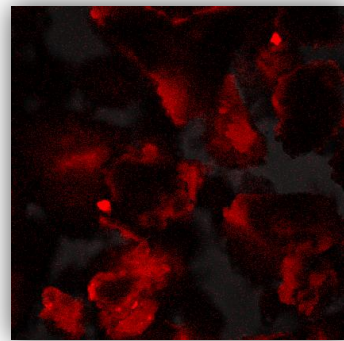
SGRA1



SGRA2



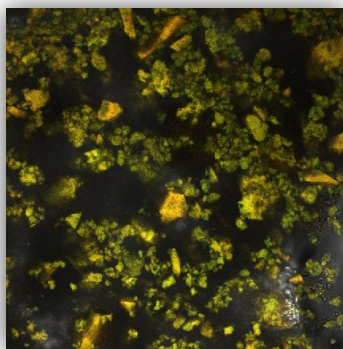
SGRA3



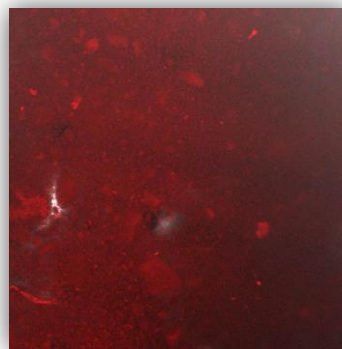
SGRA4

Figura 16 Imagens de Microscopia Confocal das rotas sol-gel ácidas com aumento de 10x

Os materiais híbridos obtidos pelas quatro rotas sol-gel ácidas apresentaram fluorescência em 559 nm mostrando a distribuição dos taninos na matriz de sílica. O híbrido SGRA1 apresentou maior homogeneidade nesta distribuição representada pela fluorescência por todos os fragmentos. As imagens obtidas das amostras SGRA2 e SGRA3 já mostram uma distribuição mais superficial, porém com a presença dos taninos com alguma intensidade no interior dos fragmentos. Na amostra SGRA4 observamos redução da fluorescência dos taninos e maior intensidade no interior somente em alguns fragmentos. Estas informações podem confirmar os resultados iniciais da avaliação colorimétrica pelo CIELab onde a amostra SGRA4 apresentou grande diferença de cor em relação aos taninos puros e as amostras SGRA2 e SGRA3 um clareamento no eixo de luminosidade, talvez pela baixa concentração de taninos na rede de sílica. Análises topográficas das imagens mostram similaridade em todas as amostras com apresentação granular com diferentes tamanhos de grãos.



SGRB1

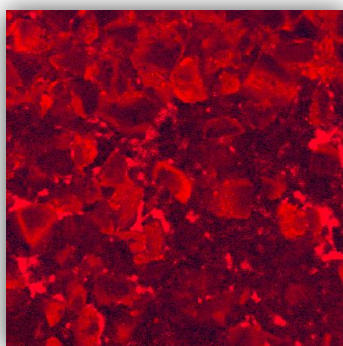


SGRB2

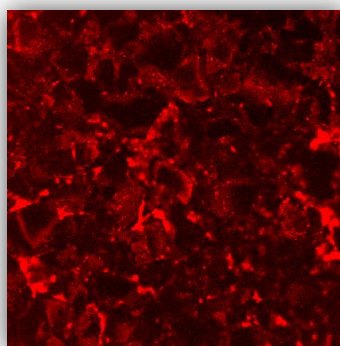
Figura 17 Imagens de Microscopia Confocal das rotas sol-gel básicas com aumento de 10x

As imagens obtidas das rotas por catálise básica são mostradas na Figura 17 e apresenta as maiores diferenças em relação aos taninos puros e das rotas anteriores. A amostra SGRB1 não apresentou fluorescência dos taninos em 559 nm. Nos demais lasers testados, apresentou fluorescência esverdeada, podendo indicar a presença de outro composto resultante do encapsulamento. Já as imagens adquiridas para a rota SGRB2 permitiu observação de baixa fluorescência indicando a presença dos taninos, porém com menor intensidade do que nas sínteses anteriores. A topografia dos materiais híbridos nas duas amostras apresentou uma diferença importante sendo mais granular na rota SGRB1 e mais compactada na rota SGRB2.

As análises de microscopia confocal das rotas envolvendo silicatos são apresentadas na Figura 18.



SGRS1



SGRS2



SGRS3

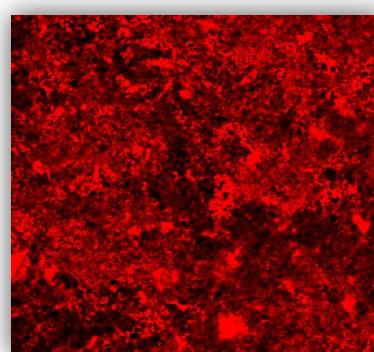
Figura 18 Imagens de Microscopia Confocal das rotas sol-gel silicato com aumento de 10x

As imagens obtidas por microscopia confocal nas três rotas silicato se diferenciam pela intensidade e distribuição. Na amostra SGRS1, a fluorescência está distribuída de maneira uniforme e intensa por todo material indicando a presença dos taninos. Já na amostra SGRS2, a fluorescência se apresenta bastante reduzida e podemos destacar alguma presença preferencial nas bordas dos materiais híbridos com pouca detecção dos taninos no interior dos grãos. A rota SGRS3 apresentou materiais com maior fluorescência dos taninos e distribuição uniforme na superfície e interior dos materiais híbridos. Das três sínteses, a amostra SGRS3 foi a que apresentou maior regularidade dos grãos tanto em tamanho, quanto na forma.

Os materiais híbridos obtidos pela rota não hidrolítica apresentaram fluorescência intensa e com uma semelhança muito grande com as imagens obtidas dos taninos puros assim como, uma identidade topográfica que provavelmente foi preservada pela ausência de água e oxigênio na síntese. A imagem obtida dos materiais híbridos da rota não hidrolítica, em comparação com os taninos puros, está ilustrada na Figura 19.



Taninos



SGRNH

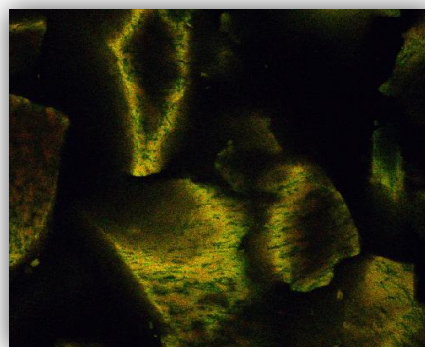
Figura 19 Imagens de Microscopia Confocal de taninos puros e da rota sol-gel não hidrolítica com aumento de 10x

A técnica de microscopia confocal também foi aplicada para os híbridos incorporados com corantes comerciais para observação da distribuição e presença dos dois compostos. Os fluoróforos dos taninos e do corante índigo foram excitados com linhas de lasers diferentes e os espectros de emissão foram bem separados e com mínimo de sobreposição somente na síntese SGRS3. As imagens mostram uma distribuição homogênea dos dois componentes.

A Figura 20 mostra as imagens ampliadas 40x da microscopia confocal obtidas dos híbridos da rota silicato SGRS3_T (tanino puro) e SGRS3_TC (tanino e corante) para avaliar a distribuição entre taninos e o corante adicionado.



SGRS3_T



SGRS3_TC

Figura 20 Imagens de Microscopia Confocal de híbridos obtidos por SGRS3_T (taninos) e SGRS3_TC (taninos e corantes) com aumento de 40x

Com a técnica de microscopia confocal é possível observar diferentes fluoróforos em uma mesma amostra em imagens de alta resolução através de cortes ópticos ⁵⁷ o que permitiu avaliarmos no caso dos híbridos mistos de corante e taninos, avaliar a presença e a distribuição nos grãos dos dois compostos. Na Figura 19 em imagens ampliadas temos os taninos bem distribuídos na amostra SGRS3_T e, na amostra SGRS3_TC a mistura dos taninos (vermelho) e do corante índigo (verde) distribuídos de maneira bastante uniforme nos híbridos.

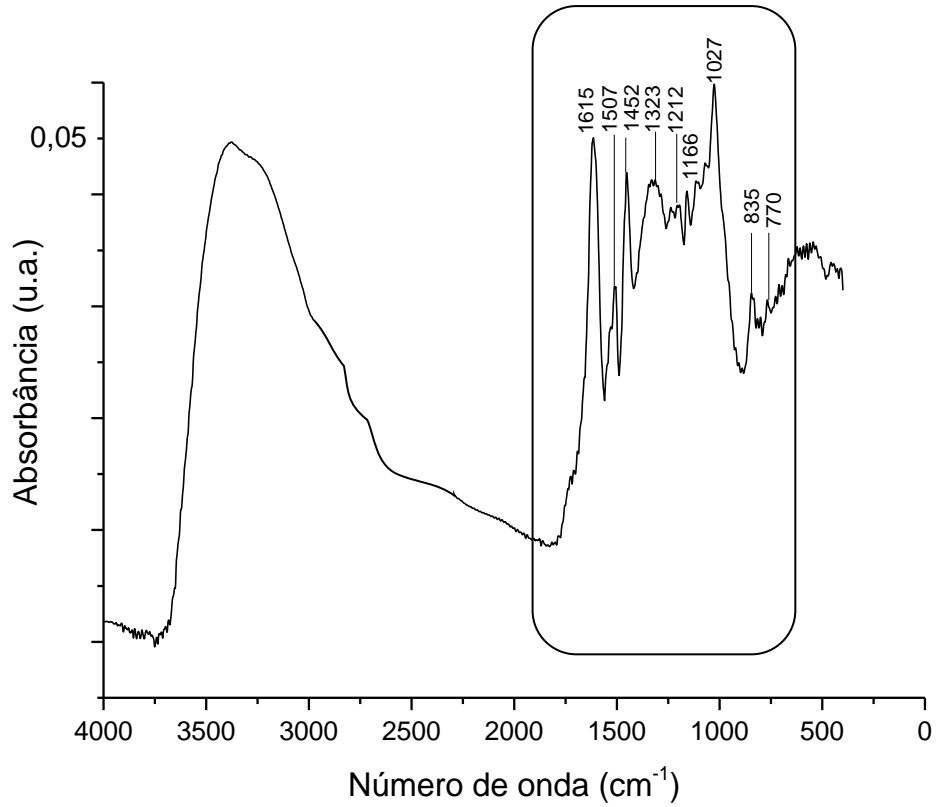
5.1.2 Análise Estrutural

Análises estruturais de espectroscopia no Infravermelho em modo de absorbância e em modo de Refletância atenuada (ATR) foram realizadas para detecção de características funcionais dos taninos nos materiais híbridos respectivamente no “bulk” e na superfície das matrizes. Complementando, análises de espectroscopia de massas por inserção direta (ID-MS) foram realizadas para análise dos fragmentos dos taninos livres e encapsulados pela avaliação da integridade massa/carga (m/z) após a síntese nas diferentes rotas o que permite confirmar a inserção e presença dos taninos na matriz de sílica. Medidas

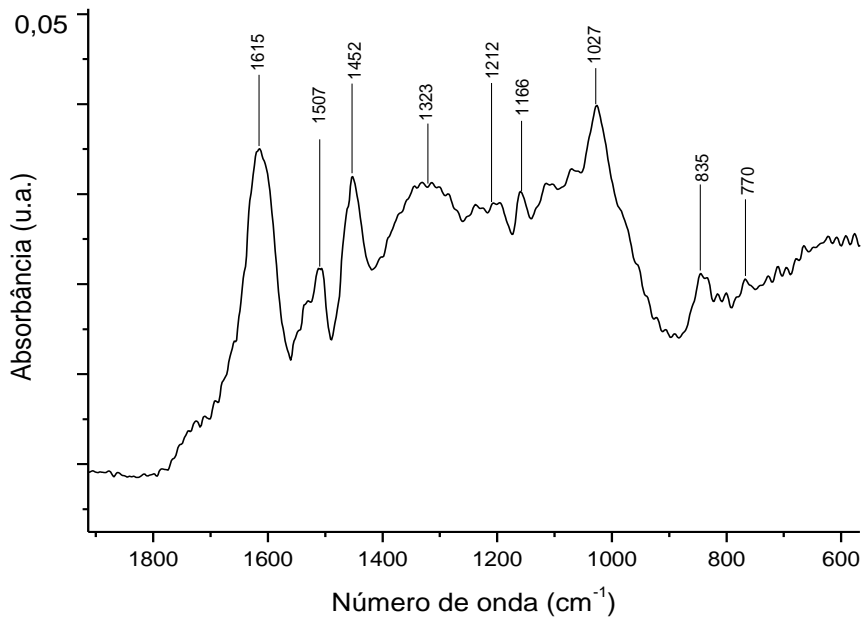
complementares de Potencial Zeta dos materiais híbridos foram realizadas para identificação das cargas na superfície dos materiais híbridos para os testes funcionais finais.

Como já visto, taninos naturais apresentam uma composição bastante complexa onde taninos condensados e hidrolisáveis podem estar presentes em diferentes proporções, além de ácido gálico, ácido tânico, catequina, pirogalo e impurezas. Grupos orgânicos característicos dos taninos foram identificados por análise de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) em modo de absorbância e em modo de refletância (ATR).

Os taninos vegetais apresentam uma região de impressão digital entre 1500 e 950 cm^{-1} que facilita a diferenciação entre taninos hidrolisáveis e condensados ⁵⁹. Esta região foi investigada para confirmação da presença dos taninos nos materiais híbridos. A presença da banda entre 1250 cm^{-1} e 1285 cm^{-1} de estiramento (C-O), característica da estrutura do anel de derivados de pirano, da classe de taninos de acácia com base em flavonóides também foi explorada ⁶⁰.



(a)



(b)

**Figura 21 (a) Espectro de FT-IR obtido do tanino não encapsulado
(b) Região da impressão digital dos taninos ampliada**

Os espectros de infravermelho obtidos por FT-IR para o tanino de *Acacia mearnsii* (Figura 21 (a)) apresentaram as seguintes bandas características: 3700 a 3200 cm^{-1} centrada em 3386 cm^{-1} : que corresponde ao estiramento das vibrações dos grupos hidroxila (O-H) e de ligações de hidrogênio entre estes grupos; em torno de 1615 cm^{-1} estiramento axial de (C-C) do anel aromático; na zona de impressão digital (Figura 21 (b)) temos: 1507 e 1452 cm^{-1} : estiramento axial C=C e C-C do anel aromático; Bandas em sequência entre 1225 e 1000 cm^{-1} com máximo de absorvância em 1027 cm^{-1} podem ser atribuídas aos estiramentos (C-O) do anel aromático; em 1166 cm^{-1} : deformação angular de (C-O-H); picos com menor intensidade são observados em 1323 cm^{-1} e 1212 cm^{-1} , indicando vibrações de deformação axial de (C-O) aromático (pirano) confirmado pelas bandas em 835 cm^{-1} e 770 cm^{-1} : deformação angular fora do plano de C-H aromático. As bandas identificadas são compatíveis com a composição de taninos com grandes concentrações de catequina e pirogalol e corroboram com aqueles relatados na literatura ^{61, 62, 63}. As bandas da impressão digital (1500 a 950 cm^{-1}) também foram identificadas na superfície como mostra o espectro de infravermelho obtido por reflexão atenuada no destaque da Figura 22, indicando homogeneidade da amostra e baixa presença de impurezas.

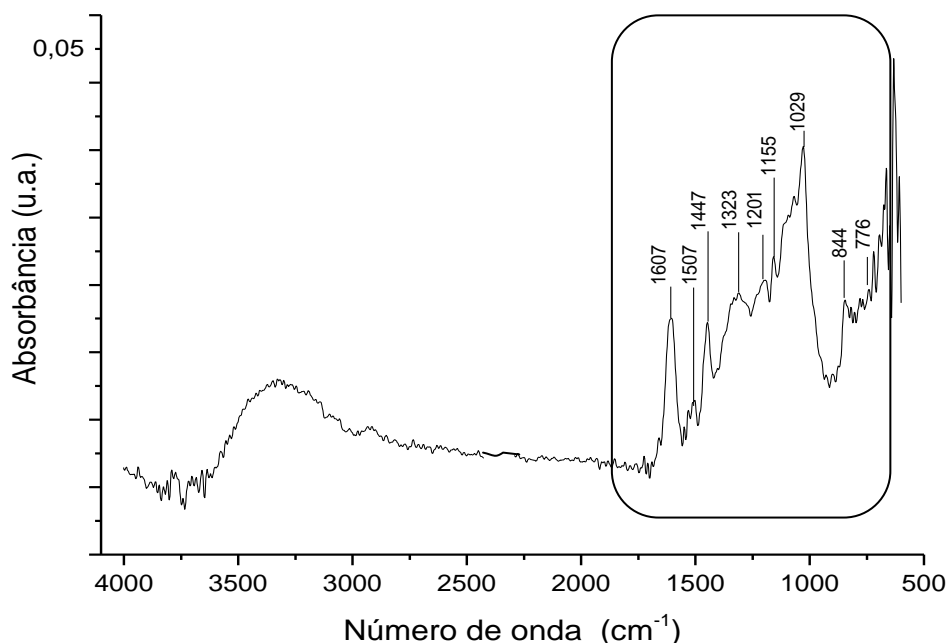


Figura 22 Espectro de ATR obtido do tanino não encapsulado e bandas da região da impressão digital em destaque

As bandas identificadas dos materiais híbridos sintetizados por catálise ácida são mostradas na Tabela VI para as amostras: SGRA1, SGRA2, SGRA3, SGRA4. Para fins comparativos, dados referentes aos taninos não encapsulados são também apresentados.

Tabela VI Frequências vibracionais características (cm^{-1}) obtidas por FT-IR e ATR dos taninos e dos materiais híbridos sintetizados por rota ácida

| Tipo de vibração | Tanino | SGRA1 | SGRA2 | SGRA3 | SGRA4 | SGRA1 | SGRA2 | SGRA3 | SGRA4 |
|------------------|--------|----------------------------|-------|-------|-------|--------------------------|-------|-------|-------|
| | | FT-IR (cm^{-1}) | | | | ATR (cm^{-1}) | | | |
| ν C=C | 1618 | 1634 | 1626 | 1623 | 1634 | 1614 | 1619 | 1617 | 1619 |
| ν C=C | 1507 | 1517 | | | 1521 | | | | |
| δ C=C-C | 1452 | 1451 | 1449 | 1458 | 1458 | | | | |
| ν C-O | 1323 | | | | | | | | |
| ν C-O | 1212 | | | | | | | | |
| δ C-OH | 1166 | | | | | | | | |
| ν C-O | 1027 | | | | | | | | |
| ν C-H | 835 | | | | | | | | |
| Φ C-H | 770 | | | | | | | | |

ν : estiramento; δ : deformação; Φ deformação fora do anel;

A Figura 23 mostra o espectro de FT-IR obtido para a amostra SGRA1 com destaque para a região da impressão digital.

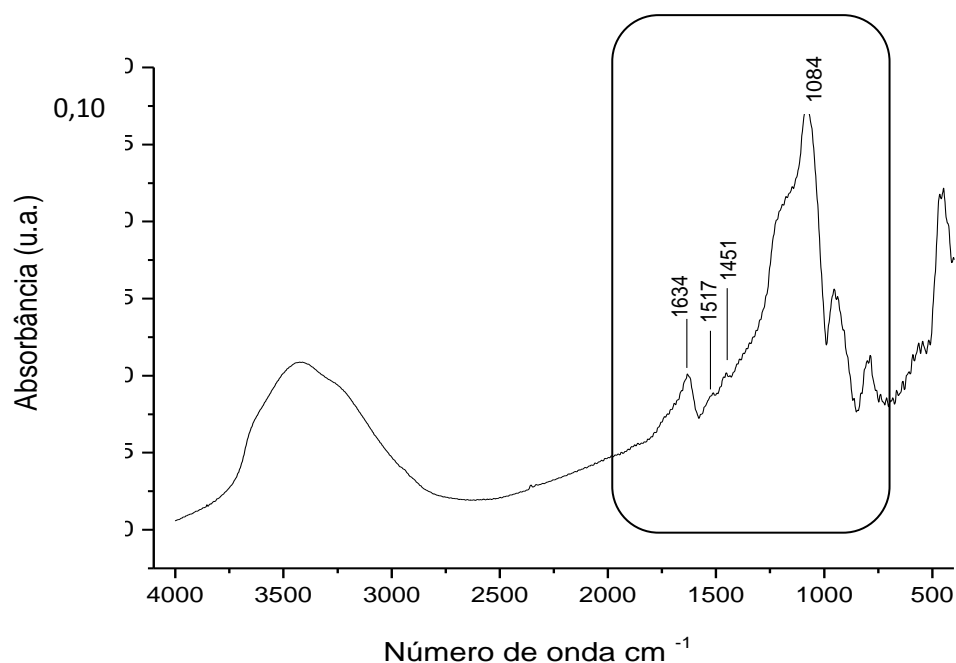


Figura 23 Espectro de FT-IR da amostra SGRA1_T e região da impressão digital em destaque

O espectro da Figura 23 mostra as bandas identificadas na amostra SGRA1_T e analisando a região em destaque temos em 1634 cm^{-1} e em 1517 cm^{-1} bandas relacionadas aos estiramentos (C=C) com deslocamentos significativos sugerindo uma interação com a rede de sílica. Temos em 1451 cm^{-1} a banda que corresponde à deformação angular (C=C-C) na mesma amostra. As demais amostras apresentaram as mesmas bandas com deslocamentos maiores na amostra SGRA4_T. Da região de impressão digital dos taninos, entre 1323 cm^{-1} e 770 cm^{-1} , nenhuma outra banda foi identificada mostrando essencialmente as bandas características que compõem a rede de sílica. Estas informações sugerem que exista alguma interação de fragmentos dos anéis aromáticos com a rede de sílica após a síntese, pois não foram identificados grupos relacionados diretamente à estrutura aromática dos taninos.

A Tabela VII destaca as bandas correspondentes dos taninos e dos materiais híbridos obtidos por rota básica das amostras SGRB1_T e SGRB2_T. Nestas amostras temos uma identificação com bandas fracas relacionadas aos principais grupos da região de impressão digital dos taninos.

Tabela VII Frequências vibracionais características (cm^{-1}) obtidas por FT-IR e ATR dos taninos e dos materiais híbridos sintetizados por rota básica

| Tipo de vibração | Tanino | SGRB1 | SGRB2 | SGRB1 | SGRB2 |
|------------------|--------|----------------------------|-------|--------------------------|-------|
| | | FT-IR (cm^{-1}) | | ATR (cm^{-1}) | |
| ν C=C | 1618 | 1625 | 1612 | 1609 | 1608 |
| ν C=C | 1507 | | 1553 | | |
| δ C=C-C | 1452 | 1404 | 1447 | | 1443 |
| ν C-O | 1323 | | 1377 | | |
| ν C-O | 1212 | | | | |
| δ C-O-H | 1166 | | | | |
| ν C-O | 1027 | | | | |
| ν C-H | 835 | | | | |
| Φ C-H | 770 | | | | |

ν : estiramento; δ : deformação; Φ deformação fora do anel;

Das informações obtidas por FT-IR e ATR das amostras da rota básica apenas a amostra SGRB2_T apresentou algumas bandas características da região de impressão digital dos taninos. O espectro da Figura 24 apresenta quatro destas

bandas em: 1612 cm^{-1} , 1553 cm^{-1} , 1447 cm^{-1} e 1377 cm^{-1} com deslocamentos significativos sugerindo uma forte interação com a rede de sílica. Nas análises por transmitância (ATR), duas bandas foram observadas em 1608 cm^{-1} e 1443 cm^{-1} , de estiramentos (C=C) e deformação (C=C-C), respectivamente. Da amostra SGRB1_T apenas foram identificadas bandas fracas em 1625 cm^{-1} e nenhuma outra banda relacionada aos taninos.

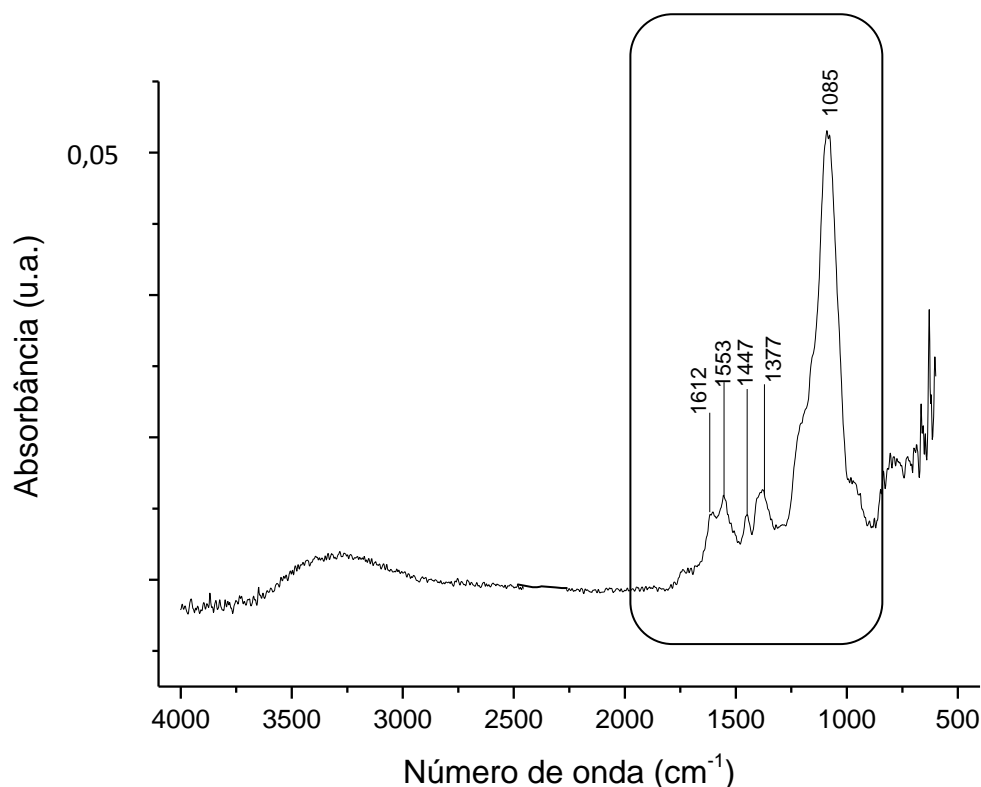


Figura 24 Espectro de FT-IR da amostra SGRB2_T e bandas da região da impressão digital em destaque

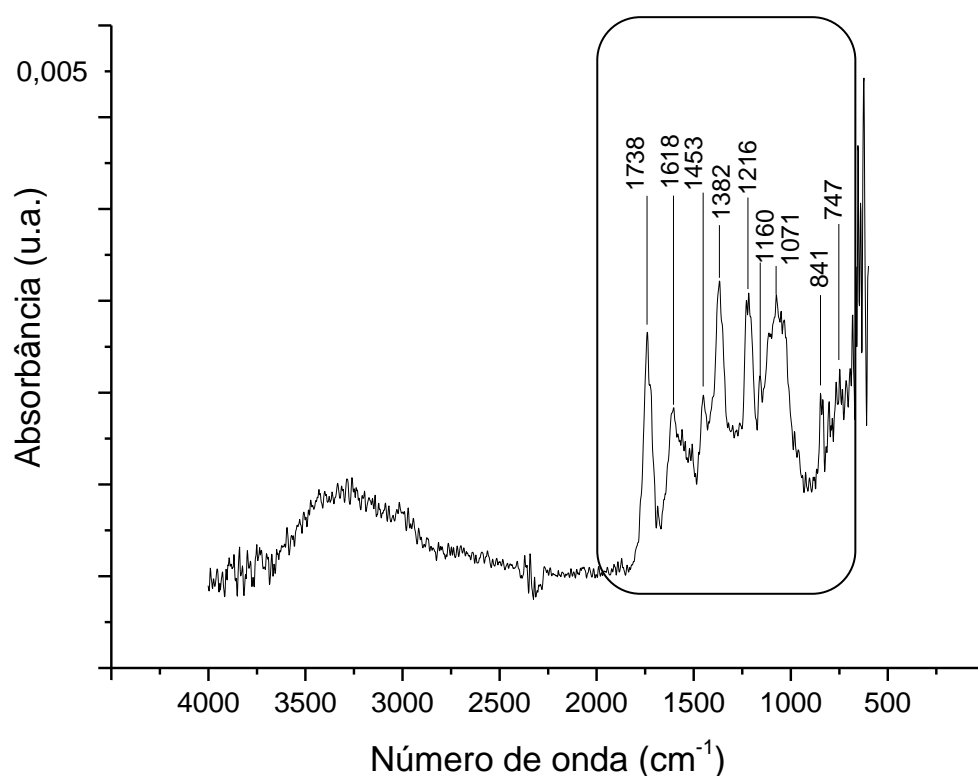
A Tabela VIII mostra as principais bandas identificadas dos taninos e para as três amostras obtidas pela rota silicato. Observa-se um aumento significativo de grupos orgânicos no interior e superfície das amostras. As três amostras obtidas pela rota silicato apresentaram espectros muito similares aos taninos não encapsulados com a região de impressão digital entre 1500 cm^{-1} e 950 cm^{-1} bastante preservada. A distribuição uniforme destes grupos nos grãos foi confirmada pela análise de ATR.

Tabela VIII Frequências vibracionais características (cm^{-1}) obtidas por FT-IR e ATR dos taninos e dos materiais híbridos sintetizados por rota silicato

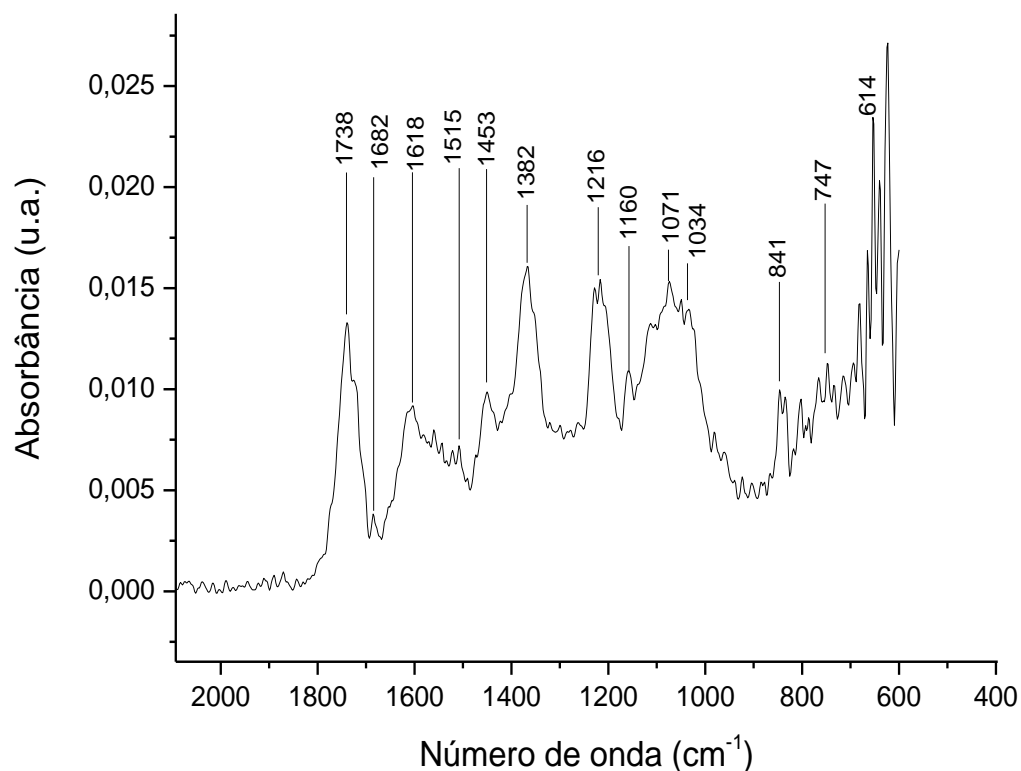
| Tipo de vibração | Tanino | SGRS1 | SGRS2 | SGRS3 | SGRS1 | SGRS2 | SGRS3 |
|------------------|--------|----------------------------|-------|-------|--------------------------|-------|-------|
| | | FT-IR (cm^{-1}) | | | ATR (cm^{-1}) | | |
| ν C-C | | | | 1682 | | | |
| ν C=C | 1618 | 1636 | 1618 | 1618 | 1619 | 1627 | 1611 |
| ν C=C | 1507 | 1518 | 1510 | 1515 | 1517 | | |
| δ C=C-C | 1452 | 1448 | 1451 | 1453 | 1445 | 1438 | 1449 |
| ν C-O | 1323 | | | | 1291 | 1301 | 1298 |
| ν C-O | 1212 | | 1207 | 1216 | | | 1242 |
| δ C-O-H | 1166 | | 1158 | 1160 | 1188 | | |
| ν C-O | 1027 | | 1027 | 1034 | | | 1035 |
| ν C-H | 835 | 841 | 845 | 841 | 840 | 835 | 842 |
| Φ C-H | 770 | 621 | 630 | 747 | | | |

ν : estiramento; δ : deformação; Φ deformação fora do anel;

Na Figura 25 temos o espectro obtido para a amostra SGRS3_T (a) e imagem ampliada da região entre 1800 cm^{-1} e 600 cm^{-1} (b).



(a)



(b)

Figura 25 Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier da amostra (a) SGRS3_T e (b) Região entre 1800 cm^{-1} e 600 cm^{-1} ampliada

A banda de estiramento (C=C) em 1618 cm^{-1} foi deslocada em 18 cm^{-1} somente na amostra SGRS1_T que também apresentou bandas de estiramento (C=C) em 1518 cm^{-1} e de deformação (C=C-C) em 1448 cm^{-1} . A banda que em 1212 cm^{-1} identifica o estiramento (C-O) do anel pirano aparece intensa nas amostras: SGRS2_T em 1202 cm^{-1} e SGRS3_T em 1216 cm^{-1} na forma de um dublete. Nas mesmas amostras deslocamentos significativos são observados nas bandas de deformação (C-O-H) em 1158 cm^{-1} e 1160 cm^{-1} e nas bandas de estiramento (C-O) em 1034 cm^{-1} na amostra SGRS3_T. Os grupos orgânicos identificados nas amostras silicato, principalmente na amostra SGRS3_T confirmam a indicação de maior concentração de taninos nestes materiais híbridos como já verificado nas análises elementares. A banda intensa em 1738 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento do grupo carbonila (C=O) residual de biftalato de potássio, utilizado nesta rota.

Tabela IX Frequências vibracionais características (cm^{-1}) obtidas por FT-IR e ATR dos taninos e dos materiais híbridos sintetizados por rota não hidrolítica

| Tipo de vibração | Tanino | SGRNH |
|------------------|----------------------------|-------|
| | FT-IR (cm^{-1}) | |
| ν C=C | 1618 | 1630 |
| ν C=C | 1507 | 1514 |
| δ C=C-C | 1452 | 1451 |
| ν C-O | 1323 | |
| ν C-O | 1212 | |
| δ C-O-H | 1166 | |
| ν C-O | 1027 | |
| ν C-H | 835 | |
| Φ C-H | 770 | |

A amostra SGRNH_T obtida pela rota não hidrolítica apresentou bandas no espectro de FT-IR em: 1630 cm^{-1} e 1514 cm^{-1} de estiramento (C=C) com deslocamentos significativos de 12 cm^{-1} e 7 cm^{-1} , respectivamente; e em: 1451 cm^{-1} da banda de deformação (C=C-C), como podem ser vistos na Figura 26.

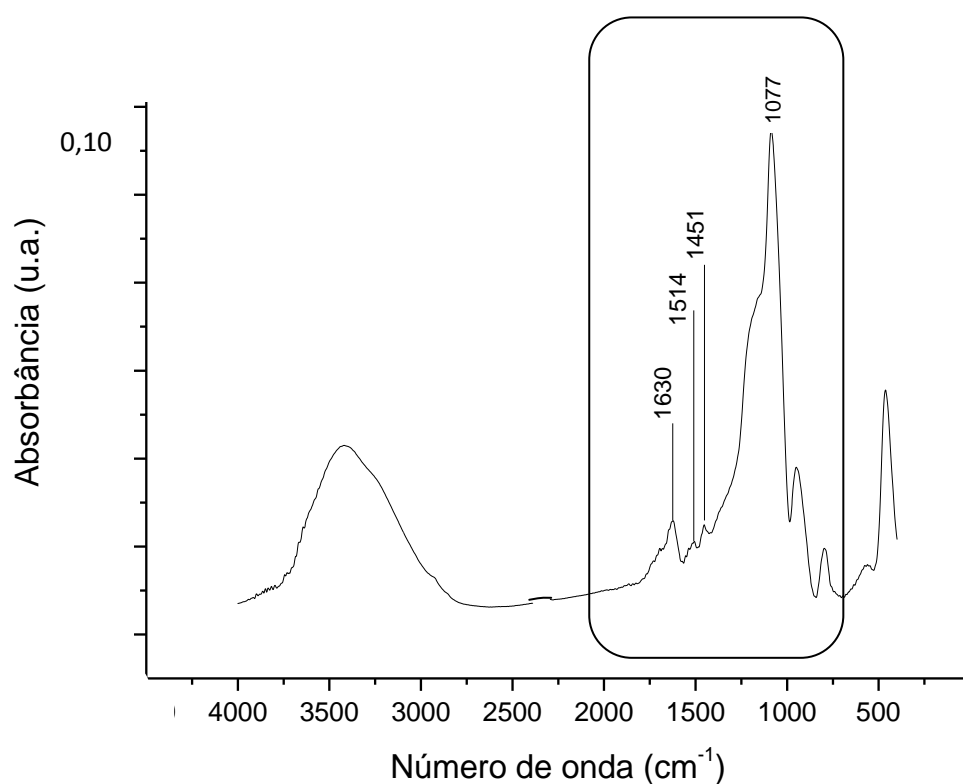


Figura 26 Espectro de FT-IR da amostra SGRNH_T e bandas da região da impressão digital em destaque

Os espectros vibracionais da sílica (região de impressão digital) também podem fornecer informações importantes relativas a aspectos estruturais da rede como tensões sobre a ligação (Si-O-Si)⁶⁴.

Materiais à base de sílica apresentam uma estrutura amorfa, resultante de uma rede aleatória de unidades elementares (SiO), organizados em ciclosiloxanos, contendo principalmente quatro e seis átomos de silício ⁶⁵. A Figura 26 mostra um diagrama esquemático dos dois tipos de arranjos com quatro e seis átomos de silício esboçando a diferença para acomodação dos taninos nas duas estruturas.

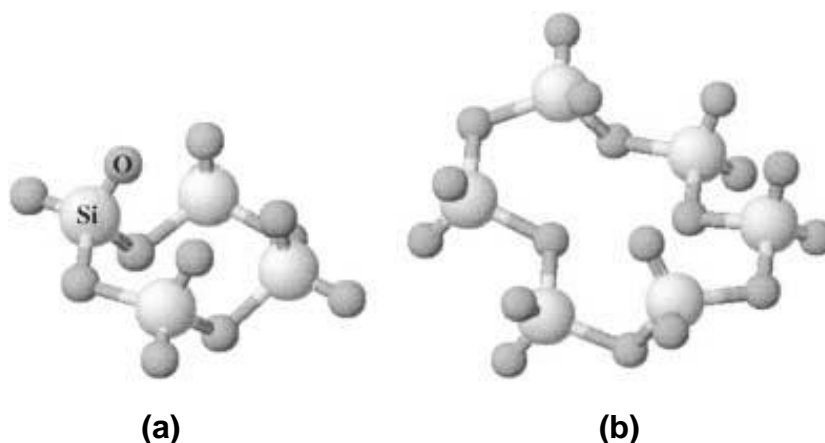


Figura 27 Diagrama esquemático dos tipos mais comuns de arranjos cíclicos primários das unidades estruturais (SiO) : (a) anel siloxano de quatro membros (SiO)₄ e (b) anel siloxano de seis membros (SiO)₆⁶⁵

As proporções dessas unidades cíclicas podem ser obtidas da deconvolução das bandas de estiramento (Si-O) e (Si-O-Si), entre 1300 cm⁻¹ e 900 cm⁻¹, que é composta de quatro componentes: as componentes longitudinais para os anéis de seis membros (LO₆) e quatro membros (LO₄) e as componentes transversais para os mesmos anéis de seis (TO₆) e quatro membros (TO₄)^{65,66}.

Uma estimativa da proporção destas unidades cíclicas de quatro ou seis membros pode ser obtida para cada amostra através da relação entre as áreas obtidas para cada componente e calculada pela Equação 27^{65,66}:

$$\% (\text{SiO})_6 = 100 \times \left[\frac{A(\text{LO}_6) + A(\text{TO}_6)}{A(\text{LO}_6) + A(\text{LO}_4) + A(\text{TO}_4) + A(\text{TO}_6)} \right] \text{ Eq. 27}$$

Na Figura 28 pode-se observar a região compreendida entre 1400 cm^{-1} e 400 cm^{-1} da amostra obtida por rota ácida (SGRA_BR) que apresenta os dois modos vibracionais LO e TO e ainda as bandas centradas em 952 , 552 e 457 cm^{-1} , correspondentes às vibrações dos grupos (Si-OH) ou (Si-O⁻) e a banda em 805 cm^{-1} atribuída ao modo *rocking* dessas mesmas espécies.

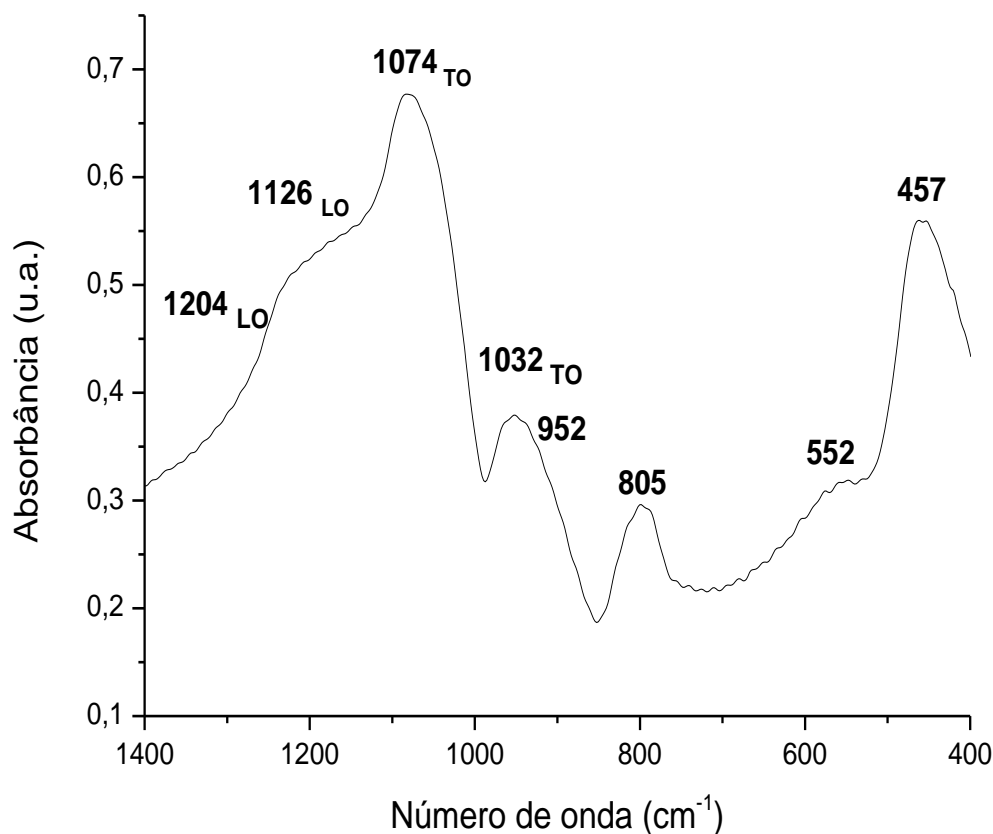


Figura 28 Bandas características para as vibrações (Si-O-Si) para amostra obtida por rota ácida SGRA_BR. Espectros adquiridos com 4 cm^{-1} de resolução. LO: modo óptico longitudinal e TO: modo óptico transversal

Nas amostras sintetizadas, as mudanças na banda de estiramento (Si-O)_{Si-O-Si} parecem estar relacionadas diretamente com uma alteração na proporção entre os componentes (SiO)₆, TO₆ e os componentes (SiO)₄, particularmente LO₄. O aumento da presença dos grupos orgânicos introduzidos em cada síntese parece estar diretamente relacionado aos resultados obtidos.

Na Figura 29 foi obtido um bom ajuste para a curva correspondente aos dados da amostra SGRA1_T através da deconvolução em quatro componentes com $r^2= 0,9940$. A banda dominante em 1074 cm^{-1} TO_4 é a componente correspondente ao estiramento (Si-O), a componente LO_6 refere-se a banda centrada em 1222 cm^{-1} , um ombro em 1144 cm^{-1} associado ao modo LO_4 e para TO_6 a banda centrada em 1033 cm^{-1} . Utilizando a Equação 22 e com as áreas obtidas de cada componente temos um percentual de anéis $(\text{SiO})_6$ de 26,3% e em torno de 73,7% de anéis com quatro membros $(\text{SiO})_4$, típico de materiais sintetizados por rota ácida.

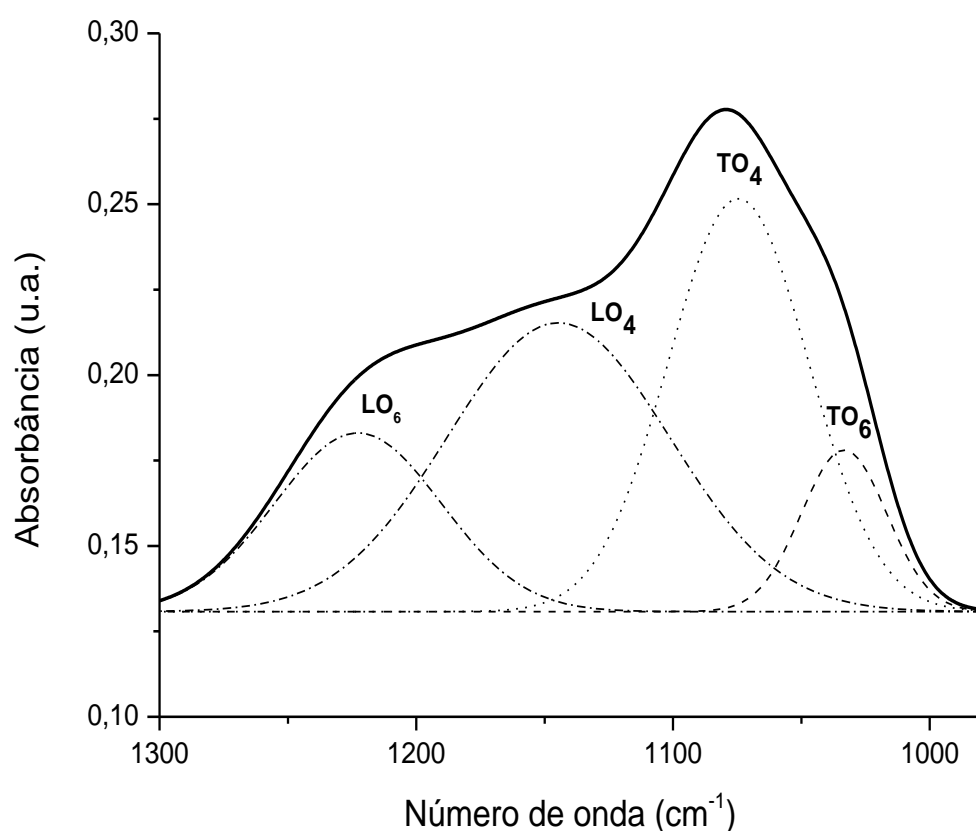


Figura 29 Deconvolução da região de estiramento (Si-O) no espectro de FTIR para a amostra SGRA1_T

Para todas as amostras, o mesmo procedimento foi realizado e os resultados obtidos para o máximo de cada contribuição, área relativa, o fator de determinação e os percentuais calculados de $(\text{SiO})_6$ encontram-se resumidos na Tabela X.

Tabela X Áreas obtidas para cada contribuição através da deconvolução da banda na região compreendida entre 1300-1000 cm^{-1} e o percentual de $(\text{SiO})_6$ encontrado para cada amostra

| Amostra | LO ₆ | LO ₄ | TO ₄ | TO ₆ | R ² | (SiO) ₆ (%) |
|-----------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|------------------------|
| | Centro da banda (cm^{-1}) / Área (u.a.) | | | | | |
| BR_SGRA | 1204 23,15 | 1126 11,23 | 1074 18,77 | 1032 5,65 | 0,9941 | 48,9 |
| SGRA1_T | 1222 4,25 | 1144 9,14 | 1074 8,26 | 1033 1,97 | 0,9940 | 26,3 |
| SGRA2_T | 1192 39,94 | 1141 5,64 | 1078 38,48 | 1031 9,04 | 0,9992 | 52,6 |
| SGRA3_T | 1204 33,77 | 1150 7,74 | 1083 48,56 | 1035 5,35 | 0,9979 | 40,9 |
| SGRA4_T | 1209 27,98 | 1155 4,58 | 1080 66,23 | 989 5,22 | 0,9995 | 31,9 |
| BR_SGRB | 1130 12,64 | 1067 4,05 | 1028 2,02 | 995 0,62 | 0,9992 | 68,6 |
| SGRB1_T | 1221 7,27 | 1144 21,51 | 1102 4,94 | 1074 19,17 | 0,9997 | 49,9 |
| SGRB2_T | 1202 3,76 | 1154 1,45 | 1085 15,5 | 1049 0,15 | 0,9996 | 18,8 |
| BR_SGRS | 1203 2,15 | 1153 0,36 | 1083 0,45 | 1068 8,12 | 0,9994 | 92,7 |
| SGRS1_T | 1181 22,14 | 1154 2,84 | 1075 6,21 | 1024 0,85 | 0,9840 | 71,8 |
| SGRS2_T | 1105 0,69 | 1037 0,02 | 1078 0,02 | 1027 0,53 | 0,9868 | 96,8 |
| SGRS3_T | 1160 32,9 | 1109 0,08 | 1069 0,46 | 1032 0,23 | 0,9927 | 98,3 |
| BR_SGRNH | 1178 5,22 | 1163 0,17 | 1076 4,12 | 1048 3,72 | 0,9990 | 67,5 |
| SGRNH_T | 1202 32,39 | 1161 2,25 | 1077 48,9 | 952 3,95 | 0,9963 | 41,5 |

Conforme os valores esboçados na Tabela X pode-se observar uma grande variação nos percentuais de anéis de seis membros $(\text{SiO})_6$ entre as amostras obtidas por diferentes rotas, variando entre 18,8% da amostra SGRB2_T e 98,3% da amostra SGRS3_T. Esta pode ser uma indicação da grande influência da natureza da síntese sol-gel utilizada no encapsulamento dos taninos. Em geral, amostras contendo maior quantidade de moléculas ou grupamentos orgânicos têm uma predominância na formação de anéis de seis membros que por serem menos tensionados possibilitam uma melhor acomodação desses grupos. O aumento das

contribuições dos modos LO_6 e TO_6 também indicam uma maior organização de longo alcance nesses materiais ^{65,66}.

Das amostras sintetizadas por rota ácida houve uma redução no percentual de $(SiO)_6$ nas amostras SGRA1, SGRA3 e SGRA4 e um pequeno aumento na SGRA2 apesar das análises de espectroscopia por reflexão difusa indicarem baixo teor de taninos encapsulados. Uma variação importante ocorreu nas amostras das rotas básicas onde o controle apresentou um percentual em torno de 68% de anéis de seis membros $(SiO)_6$ e as amostras SGRB1 49,9% e SGRB2 apenas 18,8%, reforçando também as informações obtidas por DRS. Amostras sintetizadas pelas rotas silicato apresentaram estrutura majoritariamente formada por anéis de siloxano de seis membros $(SiO)_6$. Uma redução de 21% ocorreu na amostra SGRS1, enquanto um aumento significativo foi observado nas amostras SGRS2 (96,8%) e SGRS3 (98,3%). Nesta síntese, análises anteriores já indicaram um maior percentual de encapsulamento de taninos e também uma identificação dos principais grupos orgânicos relacionados nos espectros de infravermelho. Especificamente na amostra SGRS3, o tipo de rota aplicada com a inserção de biftalato de potássio, indica uma influência no aumento de anéis de seis membros na estrutura. A síntese não hidrolítica apresentou grande aumento no percentual de anéis de quatro membros reduzindo o percentual de $(SiO)_6$ em torno de 26%, que pelas próprias condições de síntese tornaram a estrutura mais densa e compacta com a introdução dos taninos na rede de sílica.

Os espectros de massa obtidos por ID-MS dos taninos apontaram monômeros centrados nos picos entre $m/z=110$ e $m/z=169$ Da. Comparando os resultados obtidos por Venter ⁸, os taninos puros apresentaram uma grande concentração de fragmentos relacionados ao catecol, $m/z=110$, catecol com perda do anel B em $m/z=147$ de galocatequina e fragmento de pirogalol com perda do anel B em $m/z=169$. Os valores obtidos dos taninos puros foram utilizados para comparação aos picos obtidos das amostras encapsuladas para avaliar a integridade dos taninos após a síntese nas diferentes rotas.

A literatura mostra que taninos de *Acacia mearnsii* são compostos principalmente de dímeros e trímeros de galocatequina (m/z 306), catequina (m/z 290), robinetinidol (m/z 290) e fisetinidol (m/z 274). É comum a combinação de uma parte de galocatequina e duas de robinetinidol na composição dos dímeros (não

detectados no método) e os resultados indicam uma combinação mista nestas proporções. A Figura 30 mostra o mecanismo de clivagem observado para os taninos puros e seus principais fragmentos.

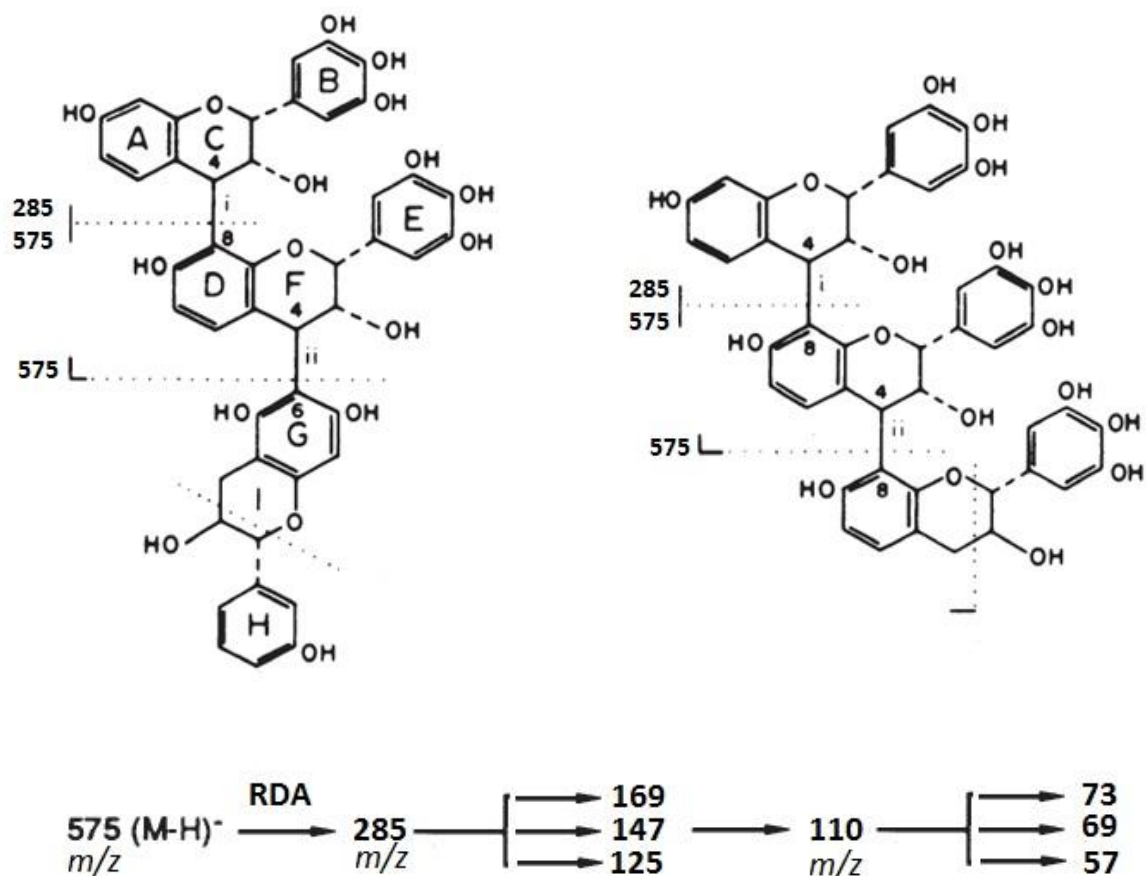


Figura 30 Esquema de fragmentação Retro Diels-Alder⁶⁰ para os taninos puros e principais fragmentos detectados

Os picos de fragmentação dos anéis A, B e C produzem diferentes fragmentos protonados. Alguns picos relativamente intensos correspondem à perda de pequenas moléculas neutras como H₂O e CO nos espectros de flavonóides e são relativamente mais estáveis que os intermediários.

Considerando a relação massa/carga (m/z: 575) correspondente a um dos dímeros, obtemos os fragmentos relacionados à clivagem retro Diels-Alder de galocatequina e robinetinidol que foram identificados nos três picos em: m/z 169, 147 e 125. O pico de maior intensidade foi detectado em m/z 110 correspondente ao catecol na fragmentação seguinte finalizando com picos em m/z 73, 69 e 57. A

Figura 31 mostra o espectro de massas obtido para o tanino puro evidenciando a concentração de fragmentos de catecol em m/z 110, confirmando as análises descritas na literatura para taninos de *Acacia mearnsii*^{54,68}.

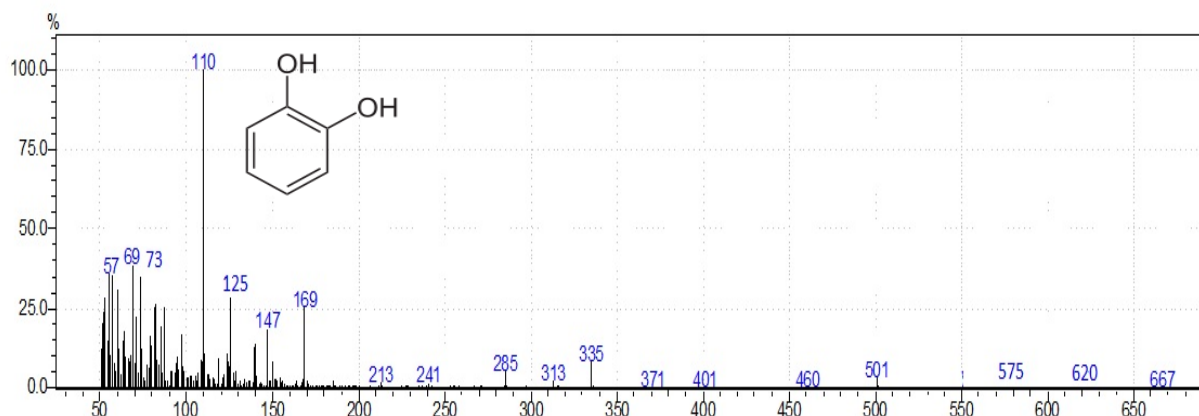


Figura 31 Espectro ID-MS obtido do tanino puro

Na análise dos materiais encapsulados avaliou-se a presença e integridade de ao menos um dos monômeros constituintes após a síntese. Nos espectros obtidos na maioria das amostras sintetizadas foram identificados picos abaixo de m/z 575. Isto pode indicar um rearranjo entre os dímeros de galocatequina e robinetinidol ou fragmentação dos anéis A, B e C durante a síntese o que foi evidenciado por picos inferiores a m/z 335 nos espectros. Apenas as amostras SGRS2_T, SGRS3_T e SGRNH_T apresentaram picos próximos de m/z 575.

As análises por ID-MS dos taninos encapsulados apresentaram espectros similares para as amostras: SGRA1_T e SGRB1_T com pico base em m/z 73 indicando fragmentos menores que podem estar relacionados a cadeias simples de $C_3H_5O_2$ nas duas amostras. Não foram identificados picos em m/z 110. Na amostra SGRA3_T onde utilizamos o quelante (biftalato de potássio) temos um sinal de baixa intensidade em m/z 110, porém a maior intensidade relativa é verificada em m/z 104 de $C_4H_8O_3$. As amostras SGRA4_T e SGRB2_T apresentaram um padrão de fragmentação diferenciado com pico base em m/z 169 correspondendo a um fragmento aromático de $C_7H_5O_5$ relacionado ao anel B de galocatequina (m/z 306).

As amostras da rota silicato: SGRS2_T e SGRS3_T e a amostra SGRNH_T apresentaram picos de maior intensidade em m/z 110 de catecol similar aos taninos. A Figura 32 mostra de forma resumida um esquema com as possíveis estruturas preservadas nas amostras sintetizadas, seguindo o padrão de fragmentação característico dos taninos.

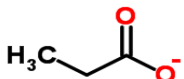
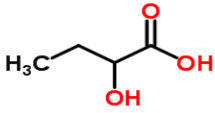
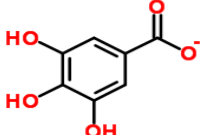
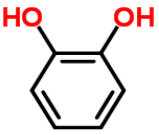
| | |
|--|---|
| <p>SGRA1_T e SGRB1_T</p>  <p>m/z: 73 Da (C₃H₅O₂)</p> | <p>SGRA3_T</p>  <p>m/z: 104 Da (C₄H₈O₃)</p> |
| <p>SGRB2_T e SGRA4_T</p>  <p>m/z: 169 Da (C₇H₅O₅)</p> | <p>SGRS2_T, SGRS3_T SGRNH_T</p>  <p>m/z: 110 Da (C₆H₆O₂)</p> |

Figura 32 Esquema dos fragmentos identificados nos materiais híbridos (m/z 100%) e possíveis estruturas ⁶⁹

Estes resultados corroboram com os demais dados obtidos por DRS e FTIR: as rotas silicato e não hidrolítica foram mais eficientes no que diz respeito à manutenção estrutural ou preservação dos taninos durante a síntese dos encapsulados mesmo apresentando algumas diferenças em suas estruturas.

Com o objetivo de analisar modificações microestruturais na estrutura da sílica foi empregada a técnica de difração de raios X (XRD). Uma característica comum dos taninos é sua forte tendência a fazer ligações com outras moléculas

orgânicas e cátions formando moléculas complexas. Esta propriedade pode inibir a formação de fases cristalinas e pode justificar o caráter tipicamente amorfo observado no padrão de difração das amostras ⁶⁷. Foram analisadas as amostras com maiores diferenças entre rotas: SGRA1, SGRA4, SGRS3 e SGRNH e todos os resultados confirmaram a natureza amorfa dos encapsulados com poucos deslocamentos entre os *halos* ($23,0^\circ \pm 1,7$) em relação à sílica. Os difratogramas de algumas das amostras são mostrados na Figura 33.

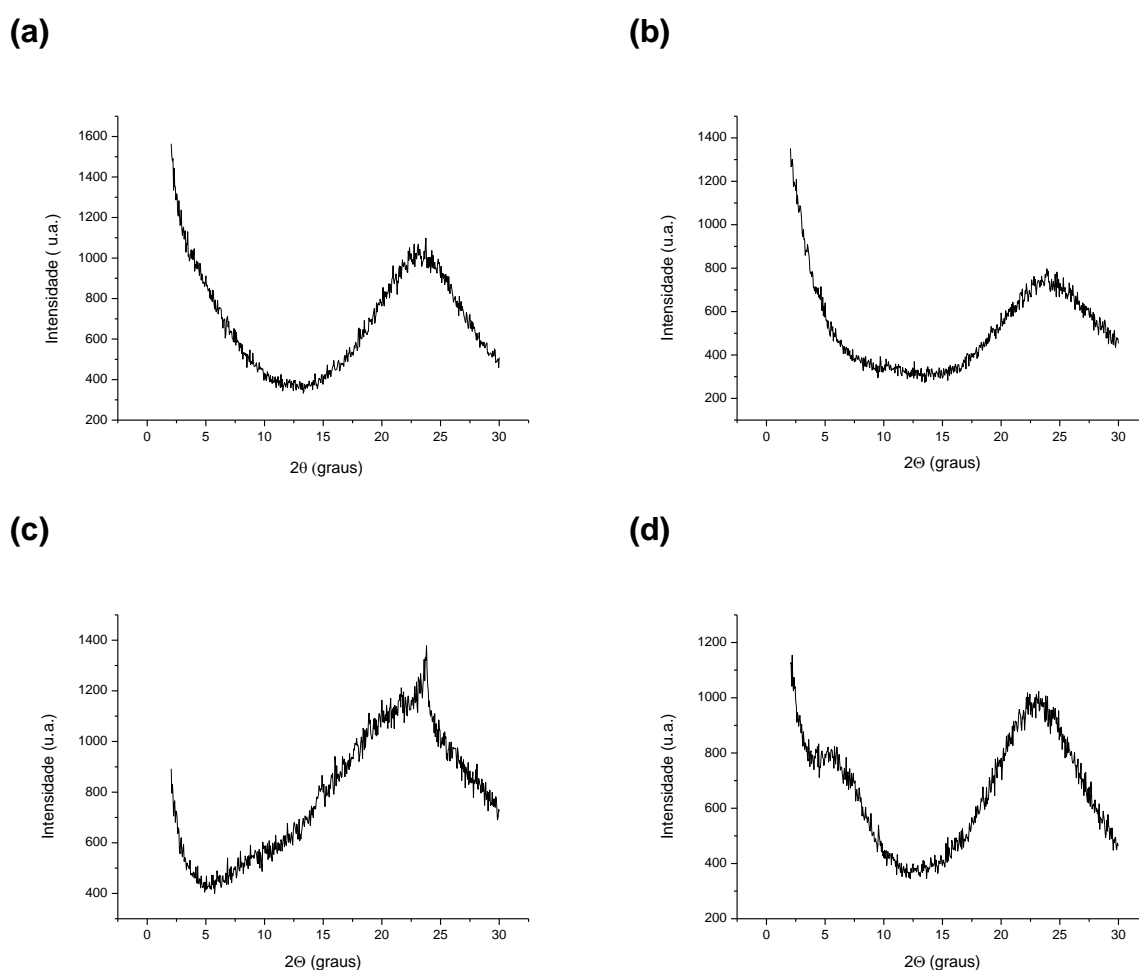


Figura 33 Difratogramas das amostras: (a) SGRA1_T (b) SGRA4_T (c) SGRS3_T (d) SGRNH_T

A posição 2θ do máximo do *halo* da sílica nas amostras encapsuladas foi: $23,3^\circ$ (SGRA1_T), $24,7^\circ$ (SGRA4_T), $23,05^\circ$ (SGRS3_T) e $23,7^\circ$ (SGRNH_T). Os diâmetros de partícula calculados pela Equação de Scherer (Eq.18) forneceram valores entre 1,12 nm e 1,2 nm para todas as amostras e média de 0,9 nm para as

amostras obtidas pelas rotas silicato. Não foi observada a presença de estruturas lamelares. Os difratogramas das amostras SGRS3_T e SGRNH_T (Figura 33 (c) e (d)) apresentaram algumas diferenças em relação às demais amostras. Na amostra SGRS3_T, com maior teor de taninos encapsulados, temos uma agregação mais frouxa das cadeias moleculares com pequenos deslocamentos influenciados pela composição do próprio tanino. Nesta síntese foram adicionados (K^+ e Na^+), cátions modificadores de rede de sílica ⁷⁰. Os átomos de Na^+ podem interromper a rede, entrando nos pontos onde dois tetraedros se unem e separando-os de tal modo que cada tetraedro fica com um vértice livre com um oxigênio não compartilhado promovendo as pequenas alterações observadas. A amostra SGRNH_T apresentou mais de um halo indicando que a estrutura tem ordem de curto alcance, mas os átomos dentro das subunidades se arranjam de modo ordenado e não aleatório.

Complementando as análises estruturais foram realizadas medidas de Potencial Zeta. O valor medido fornece uma indicação a respeito da estabilidade da suspensão. Valores de Potencial Zeta superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV são estáveis, enquanto aquelas cujo valor se situa acima de -30 mV e abaixo de +30 mV são instáveis e podem flocular. Como se percebe, esta propriedade das suspensões permite uma avaliação objetiva sobre o comportamento estável ou não das mesmas ^{58,59}. O ponto isoelétrico das suspensões não foi determinado. Os resultados obtidos do Potencial Zeta são mostrados na Tabela XI assim como os valores obtidos de condutividade e mobilidade eletroforética que é uma medida relativa de quão rápido as partículas se movem no campo elétrico, informações que poderão ser utilizadas no ajuste de processos.

Tabela XI Valores obtidos de Potencial Zeta, mobilidade eletroforética e condutividade dos materiais híbridos

| Amostra | Potencial Zeta (mV) | Mob. eletroforética ($\mu\text{mcm/Vs}$) | Condutividade (mS/cm) |
|--------------|---------------------|--|-----------------------|
| Tanino livre | $-16,0 \pm 0,458$ | -1,256 | 0,497 |
| BR_SGRA | $-6,4 \pm 0,283$ | -0,504 | 0,516 |
| SGRA1_T | $-10,3 \pm 0,100$ | -0,808 | 0,451 |
| SGRA2_T | $-15,7 \pm 0,493$ | -1,228 | 0,262 |
| SGRA3_T | $-12,9 \pm 0,945$ | -1,009 | 0,358 |
| SGRA4_T | $7,4 \pm 0,342$ | 0,579 | 5,470 |
| BR_SGRB | $-5,0 \pm 0,1$ | -0,392 | 0,133 |

| | | | |
|-----------------|---------------|--------|-------|
| SGRB1_T | -43,8 ± 0,451 | -3,436 | 0,121 |
| SGRB2_T | -19,1 ± 0,173 | -1,498 | 0,934 |
| BR_SGRS | -46,6 ± 0,1 | -3,650 | 6,560 |
| SGRS1_T | -12,4 ± 0,1 | -0,972 | 0,766 |
| SGRS2_T | -17,5 ± 0,1 | -1,372 | 1,990 |
| SGRS3_T | -35,8 ± 1,0 | -2,805 | 1,430 |
| BR_SGRNH | -2,1 ± 0,1 | -0,164 | 0,998 |
| SGRNH_T | -4,1 ± 0,1 | -0,319 | 1,070 |

O valor do Potencial Zeta pode nos dar uma ideia geral sobre a modificação da superfície das sílicas devido à adsorção de compostos fenólicos sobre a superfície dos materiais híbridos. Os materiais foram previamente lavados com etanol e água deionizada para eliminação de resíduos de síntese e não apresentaram diferenças significativas nas medições finais. Os híbridos obtidos por rota ácida apresentaram valores negativos entre -15,7 mV e -10,2 mV nas amostras SGRA1_T, SGRA2_T e SGRA3_T. A exceção foi a amostra SGRA4_T que apresentou valor positivo (7,4 mV) não indicando a presença de taninos na superfície do material híbrido. Uma alteração significativa das amostras obtidas por rota básica foi observada nas amostras: SGRB1_T com valor calculado em -43,8 mV e na SGRB2_T com -19,1 mV, valores bastante superiores ao controle medido em torno de -5,0 mV. O valor obtido para SGRB1_T confere maior estabilidade em relação ao tanino puro. Os materiais híbridos obtidos por rota silicato: SGRS1_T e SGRS2_T apresentaram valores parecidos com os híbridos da rota ácida, -12,4 mV e -17,5 mV respectivamente, porém com grandes deslocamentos em relação ao controle -46,6 mV. O valor do Potencial Zeta para a amostra SGRS3_T foi de -35,8 mV que confere tendência à estabilidade quando comparado ao controle e ao tanino puro. Os materiais híbridos da rota não hidrolítica apresentaram pouca diferença entre o controle e o híbrido, variando de -2,1 mV do controle para -4,1 mV do material híbrido.

5.1.3 Análise Textural

A porosidade dos materiais híbridos foi caracterizada por isotermas de adsorção de nitrogênio, calculadas pelos métodos de BET e BJH. Foram determinados: área específica (A_{BET}), diâmetro de poro ($D_{p_{BJH}}$), volume de poro (V_p)

e a distribuição dos poros. A forma da isoterma e seu padrão de histerese fornecem informações úteis sobre o mecanismo de fisissorção, as interações entre o sólido e os gases, e pode prever os tipos de poros presentes no adsorvente. IUPAC³⁹ classifica as isotermas de adsorção em seis tipos (tipo I a VI), juntamente com o padrão de quatro histereses tipos (H1 a H4). Os padrões de histerese H1 e H4 são característicos de materiais mesoporosos. A Tabela XII mostra os valores obtidos de área específica (S_{BET}), diâmetro de poro ($D_{p_{BJH}}$) dos materiais híbridos comparados às sílicas sintetizadas nas mesmas condições sem adição dos taninos.

Tabela XII Análise da porosimetria de nitrogênio dos materiais híbridos e das sílicas puras

| Amostra | S_{BET} ($m^2.g^{-1}$) | $D_{p_{BJH}}$ (Å) | V_p ($cm^3.g^{-1}$) | c_{BET} |
|-----------------|---|-------------------------------------|--|-----------------------------|
| BR_SGRA1 | 653,5 | 24,1 | 0,1484 | - |
| SGRA1_T | 86,3 | 28,5 | 0,0190 | 835,1 |
| BR_SGRA2 | 598,0 | 19,5 | 0,2916 | - |
| SGRA2_T | 172,3 | 25,8 | 0,1437 | 35,9 |
| BR_SGRA3 | 600,0 | 25,3 | 0,0820 | - |
| SGRA3_T | 255,0 | 32,8 | 0,2890 | 83,3 |
| BR_SGRA4 | 195,9 | 30,0 | 0,1469 | - |
| SGRA4_T | 250,2 | 24,1 | 0,0580 | 398,6 |
| BR_SGRB1 | 59,7 | 122,1 | 0,9610 | - |
| SGRB1 | 17,7 | 136,6 | 0,0650 | 100,9 |
| BR_SGRB2 | 13,5 | 201,3 | 0,0650 | - |
| SGRB2 | 2,6 | 126,7 | 0,0068 | 25,61 |
| BR_SGRS3 | 5,37 | 158,6 | 0,0450 | - |
| SGRS1_T | 11,00 | 127,0 | 0,1380 | - |
| SGRS2_T | 5,37 | 221,8 | 0,0440 | - |
| SGRS3_T | 0,96 | 349,0 | 0,0006 | 13,8 |
| BR_SGRNH | 39,0 | 13,0 | 0,0200 | - |
| SGRNH_T | 1,65 | 216,3 | 0,0021 | 22,01 |

De acordo com a Tabela XII as áreas variam amplamente de 1,65 a 653 m^2 . Os materiais híbridos obtidos por rota ácida obtiveram os maiores valores de S_{BET}

coerentes com os resultados encontrados na literatura ^{25,30}, seguida das amostras da rota básica e silicato. Dos valores obtidos, para as sílicas puras, observa-se que a inserção dos taninos promoveu a redução de área em todas as amostras com exceção da amostra SGRA4_T. Os diâmetros de poro (Dp) aumentaram na maioria dos materiais híbridos variando em torno de 20% nas amostras obtidas por rota ácida, com exceção da amostra SGRA4_T.

As amostras obtidas por rota básica obtiveram reduções de Dp de 10% em SGRB1_T e em torno de 60% na SGRB2_T. Os maiores Dp foram observados nas amostras das rotas silicato e não hidrolítica que podem estar relacionados a efeitos estéricos causados pelas moléculas de taninos encapsulados e pelas baixas áreas específicas apresentadas nestas rotas para todas as amostras. Assim, os materiais híbridos são mesoporosos com Dp entre 20 e 500 Å. As amostras SGRA1_T e SGRA4_T apresentam valores baixos de Dp: 28,5 Å e 24,1 Å, e valores de C_{BET} (constante de BET) altos: 835 e 398 respectivamente. Esta informação indica uma estrutura microporosa para as duas amostras. A isoterma de adsorção de nitrogênio da amostra SGRA1_T é mostrada na Figura 34.

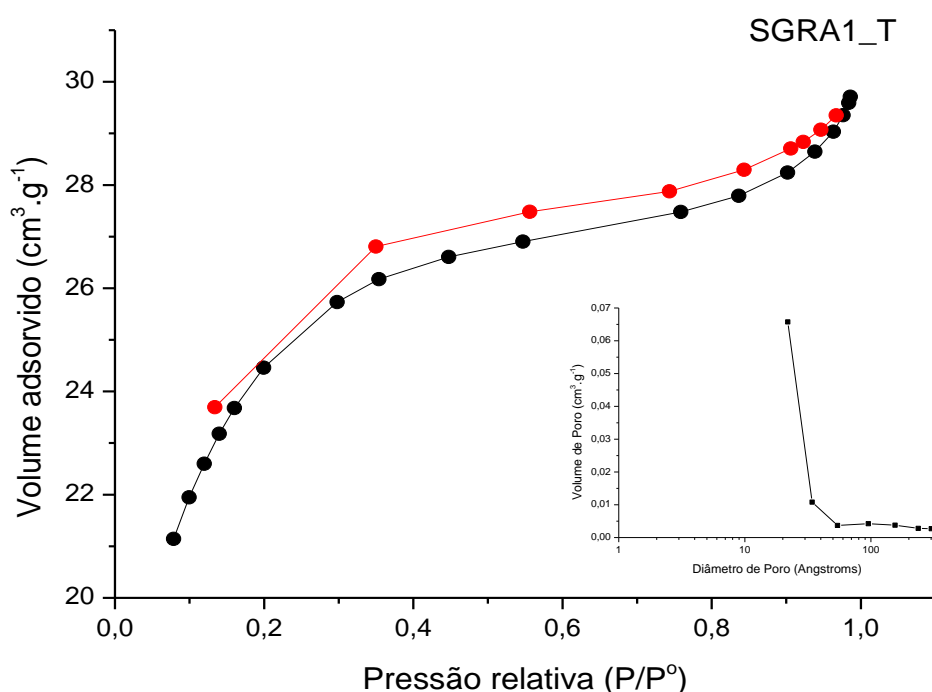
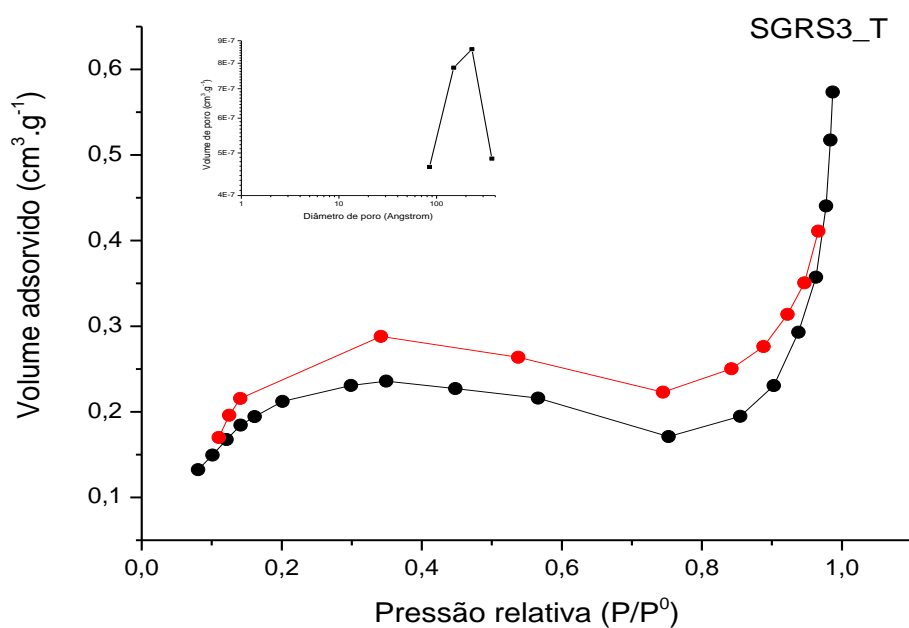
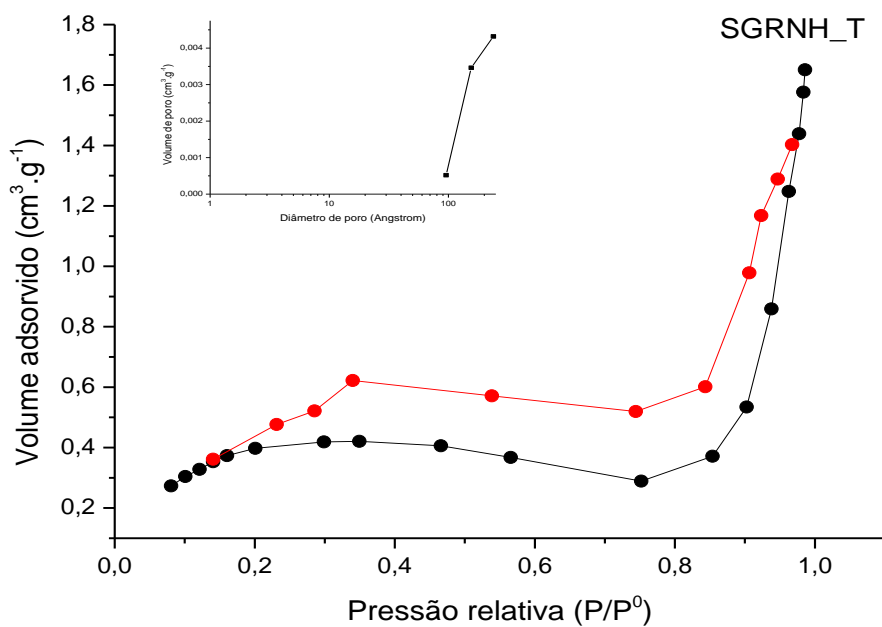


Figura 34 Isothermas de adsorção(●) e dessorção (●) de nitrogênio e curva de distribuição de poros (detalhe) da amostra SGRA1_T

A estrutura mesoporosa dos materiais híbridos está demonstrado nas isotermas típicas obtidas para as amostras SGRS3_T e SGRNH_T na Figura 35.



(a)



(b)

Figura 35 Isotermas de adsorção(●) e dessorção (●) de nitrogênio e curvas de distribuição de poros (detalhe) das amostras: (a) SGRS3_T e (b) SGRNH_T

As maiores diferenças entre amostras na análise das isotermas são observadas nas amostras da rota ácida que podem ser classificadas como do tipo II e as demais isotermas do tipo IV. Como mencionado anteriormente, a histerese indica a presença de mesoporos. Esses materiais não são puramente mesoporosos pois não há indicação do enchimento de mesoporos que resultaria em um platô a pressões relativamente mais elevadas como em uma típica isoterma do tipo IV (Figura 35 (a) e (b)). Uma característica importante observada em muitos padrões de histerese é o fechamento forçado do ramo de dessorção onde a isotérmica 'fecha' as isotermas a pressões relativas P / P_0 entre 0,35 - 0,45 como visto na amostra SGRA1_T (Figura 34) que mostra o desaparecimento da histerese durante a dessorção, o que normalmente ocorre em poros com diâmetros menores do que 40 Å. Nestes poros, as forças de tensão superficial que são mais fortes do que a resistência à tração do líquido causam o colapso do menisco o que leva a uma evaporação espontânea da fase líquida. A presença de um "fechamento forçado" das isotermas de adsorção e dessorção pode indicar um volume significativo de poros com diâmetros menores que 40 Å⁷¹.

A estrutura de partículas fractais foi estudada pela técnica de Espalhamento de Raios X em Baixo Ângulo (SAXS) que investiga as diferenças nas densidades eletrônicas do material através do perfil de intensidade de espalhamento de Raios X. O ajuste unificado foi utilizado para interpretação da organização em diferentes escalas de tamanho da estrutura hierárquica. Neste procedimento a curva de espalhamento pode ser ajustada pela utilização de um ou mais níveis consecutivos, onde cada nível é composto por uma região tipo Guinier, que permite estimativas do raio de giro (R_g) e uma região linear com decaimento seguindo a chamada de Lei das Potências, permitindo a avaliação de detalhes sobre a organização do material.

A maioria dos materiais híbridos apresentaram curvas de SAXS com três níveis de organização. As amostras da rota silicato apresentaram curvas em três níveis e uma série de picos no primeiro nível que impossibilitou o cálculo do tamanho das partículas primárias pelo SAXS. Um modelo matemático específico deve ser desenvolvido para o tratamento dos dados. As análises de XRD das amostras silicato não indicaram estruturas lamelares que justificassem a presença destes picos e as partículas apresentaram diâmetros menores que 1 nm. Os

resultados obtidos das curvas de SAXS para as demais amostras são apresentados na Tabela XIII.

Tabela XIII Raio de giro (Rg) e declividade (P) das curvas obtidas para as amostras em cada rota

| Amostra | Nível 1 Rg (nm) | Nível 2 | | Nível 3 |
|----------------|--------------------|---------|-----|---------|
| | | Rg (nm) | P | P |
| SGRA1_T | 0,32 | 3,4 | 1,8 | 3,4 |
| SGRA2_T | 0,27 | 7,2 | 2,7 | 3,6 |
| SGRA3_T | 0,32 | 19,9 | 3,8 | 1,6 |
| SGRA4_T | 0,26 | 1,7 | 4,0 | 3,7 |
| SGRB1_T | 0,33 | 10,7 | 3,7 | 3,0 |
| SGRB2_T | 0,29 | 7,1 | 2,7 | - |
| SGRS1_T | ND | ND | ND | ND |
| SGRS2_T | ND | ND | ND | ND |
| SGRS3_T | ND | ND | ND | ND |
| SGRNH_T | 1,06 | 11,2 | 3,8 | - |

ND: não determinado

Os valores de raio de giro (Rg) no primeiro nível, das partículas primárias, variaram entre 0,26 e 1,06 nm. Os menores valores de Rg foram observados em: SGRA2_T (Rg = 0,27), SGRA4_T (Rg = 0,26) e SGRB2_T (Rg = 0,29); para SGRA1_T e SGRA3_T (Rg = 0,32), e SGRB1_T (Rg = 0,33). O maior Rg (1,06 nm) foi observado na amostra SGRNH_T. Os valores próximos do Rg das amostras no primeiro nível se diferenciam na organização das partículas secundárias no segundo nível que, pelos valores obtidos de P variaram entre 1,8 e 4,0. A amostra SGRA1_T (P= 1,8) apresenta estrutura do tipo fractal de massa (caule-folha), as amostras SGRA2_T e SGRB2_T (P= 2,7) estrutura fractal de massa rugosa, e as demais (P= 3,7 e 3,8) fractal de superfície com estrutura esférica com alguma rugosidade. As amostras SGRA2_T e SGRB2_T também apresentam maior rugosidade (P = 2,7) em comparação com as amostras SGRA3_T e SGRB1_T (P=3,8) e SGRA4_T e SGRNH_T (P=3,7). Os valores de Rg no segundo nível variaram de 1,7 nm (SGRA4_T) a 19,9 nm (SGRA3_T) mostrando grande diferença no tamanho e organização das partículas neste nível. No nível 3 a amostra SGRA3_T (P = 1,6) se

define com uma estrutura caule-folha e as demais amostras com valores de P entre 3 e 3,7 estrutura rugosa. A amostra SGRNH_T, com dois níveis e $P = 3,8$ apresenta estrutura quase esférica com alguma rugosidade na superfície. A Figura 36 mostra as curvas de SAXS obtidas para as amostras SGRNH_T e SGRA2_T.

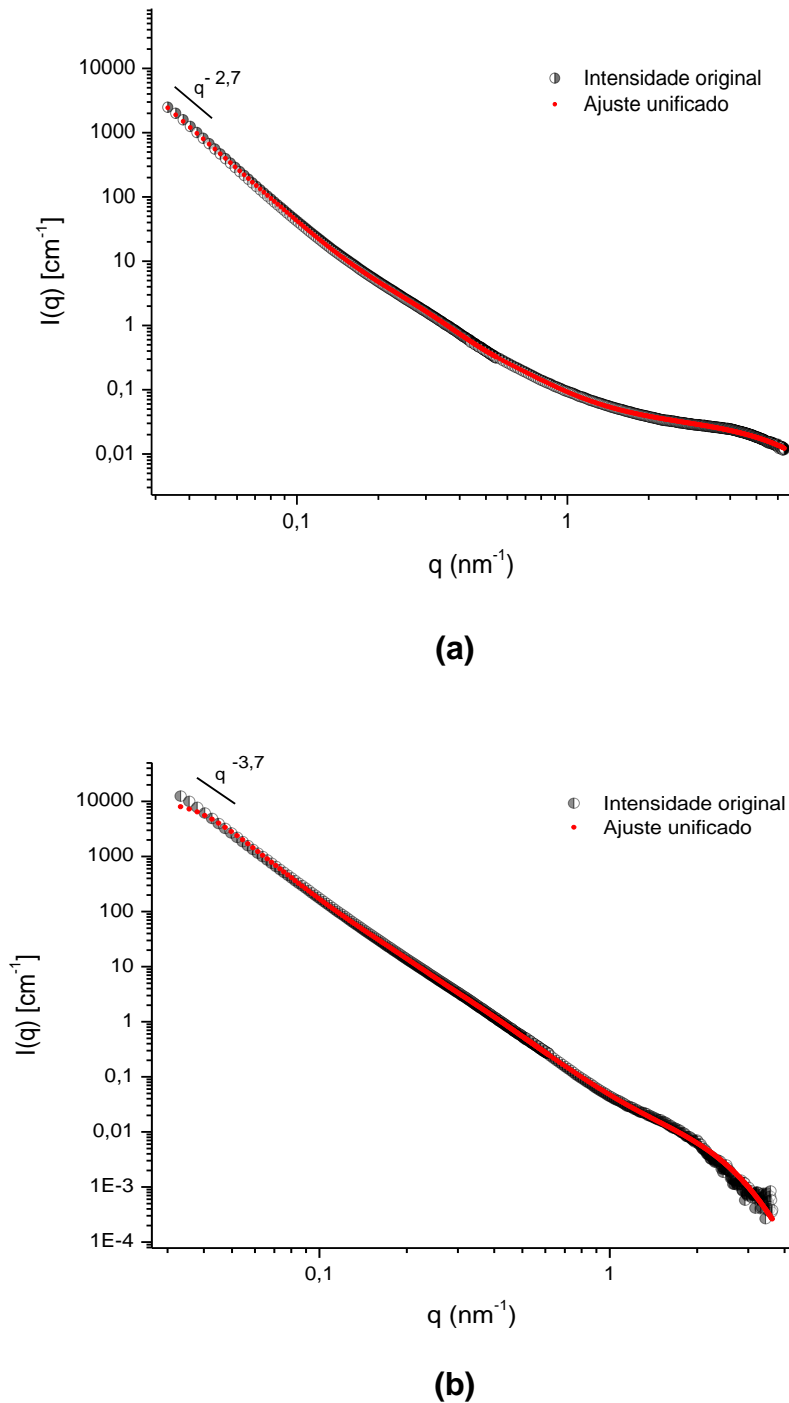


Figura 36 Curvas de SAXS obtidas para as amostras:
(a) SGRA2_T e (b) SGRNH_T

5.1.4 Análise Morfológica

As micrografias obtidas por SEM são apresentadas para as amostras obtidas da rota ácida na Figura 37.

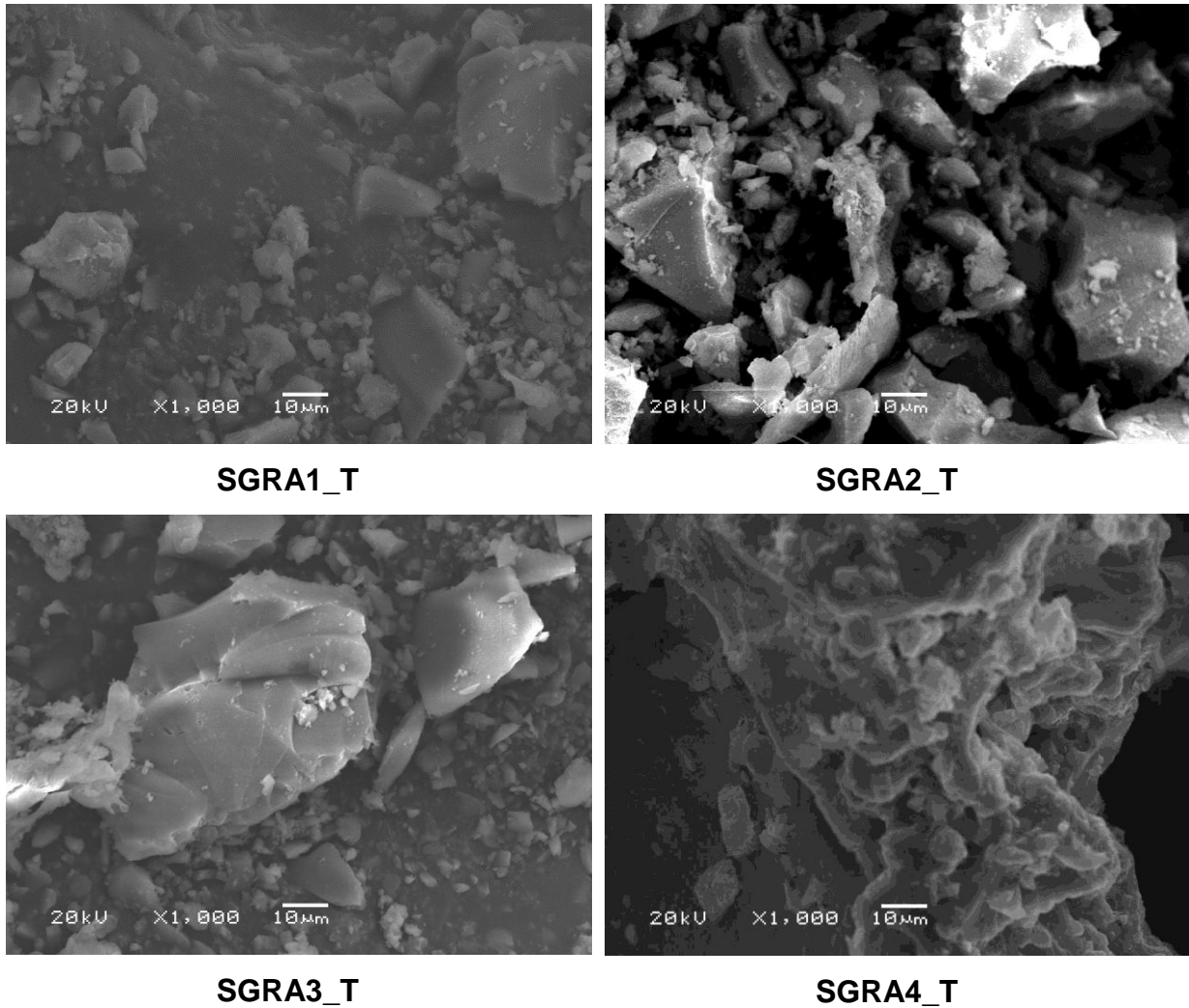
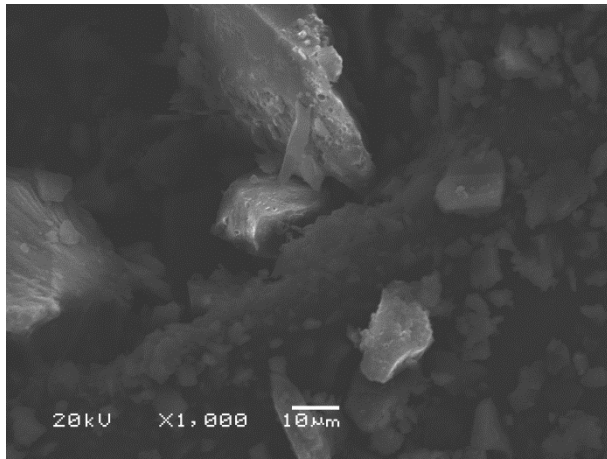
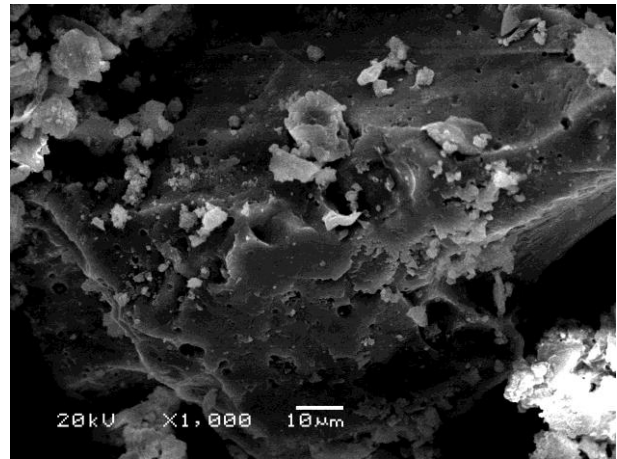


Figura 37 Micrografias obtidas por SEM para as amostras preparadas por rota ácida (SGRA1_T, SGRA2_T, SGRA3_T e SGRA4_T)

Em todas as amostras da rota ácida observa-se uma superfície compacta com algumas formações granulares de morfologia irregular com diferentes tamanhos de grãos. As diferenças de tamanhos de grão podem ser decorrentes apenas de diferenças na moagem dos materiais.



SGRB1_T



SGRB2_T

Figura 38 Micrografias obtidas por SEM para as amostras preparadas por rota básica (SGRB1_T e SGRB2_T)

As micrografias dos materiais híbridos obtidos por rota básica apresentaram uma superfície mais rugosa que as amostras da rota ácida mostrando alguma porosidade e tamanhos de grão irregulares (Figura 38). Nas duas amostras observa-se alguma heterogeneidade na distribuição dos taninos na sílica.

Os taninos puros apresentam uma superfície bastante singular nas imagens obtidas por SEM como mostradas na Figura 39. Algumas similaridades são observadas nas rotas silicato e não hidrolítica.

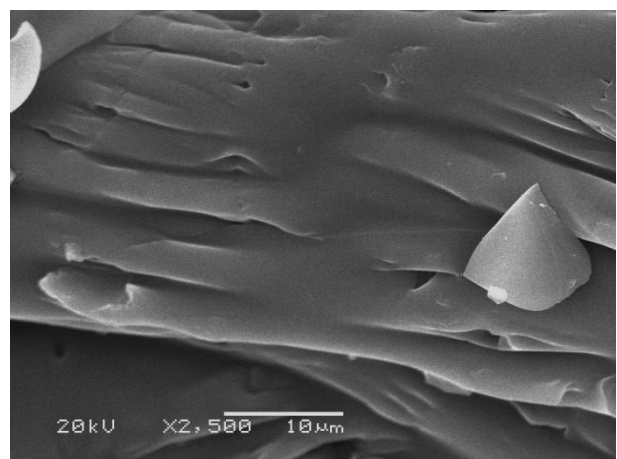
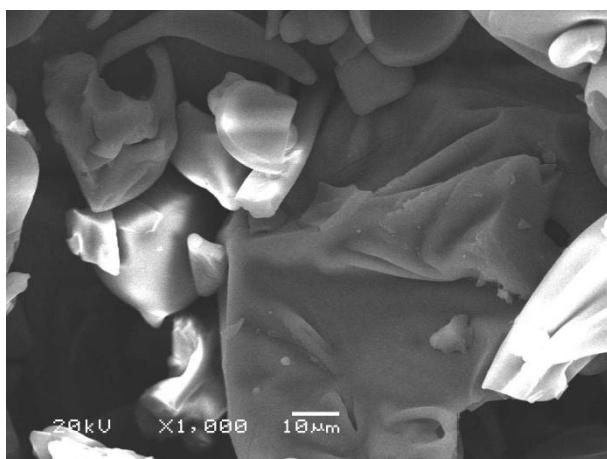


Figura 39 Micrografias obtidas por SEM para os taninos sem encapsulamento

A Figura 40 mostra as micrografias obtidas para os materiais híbridos obtidos pela rota silicato e a superfície da sílica controle sem adição de taninos.

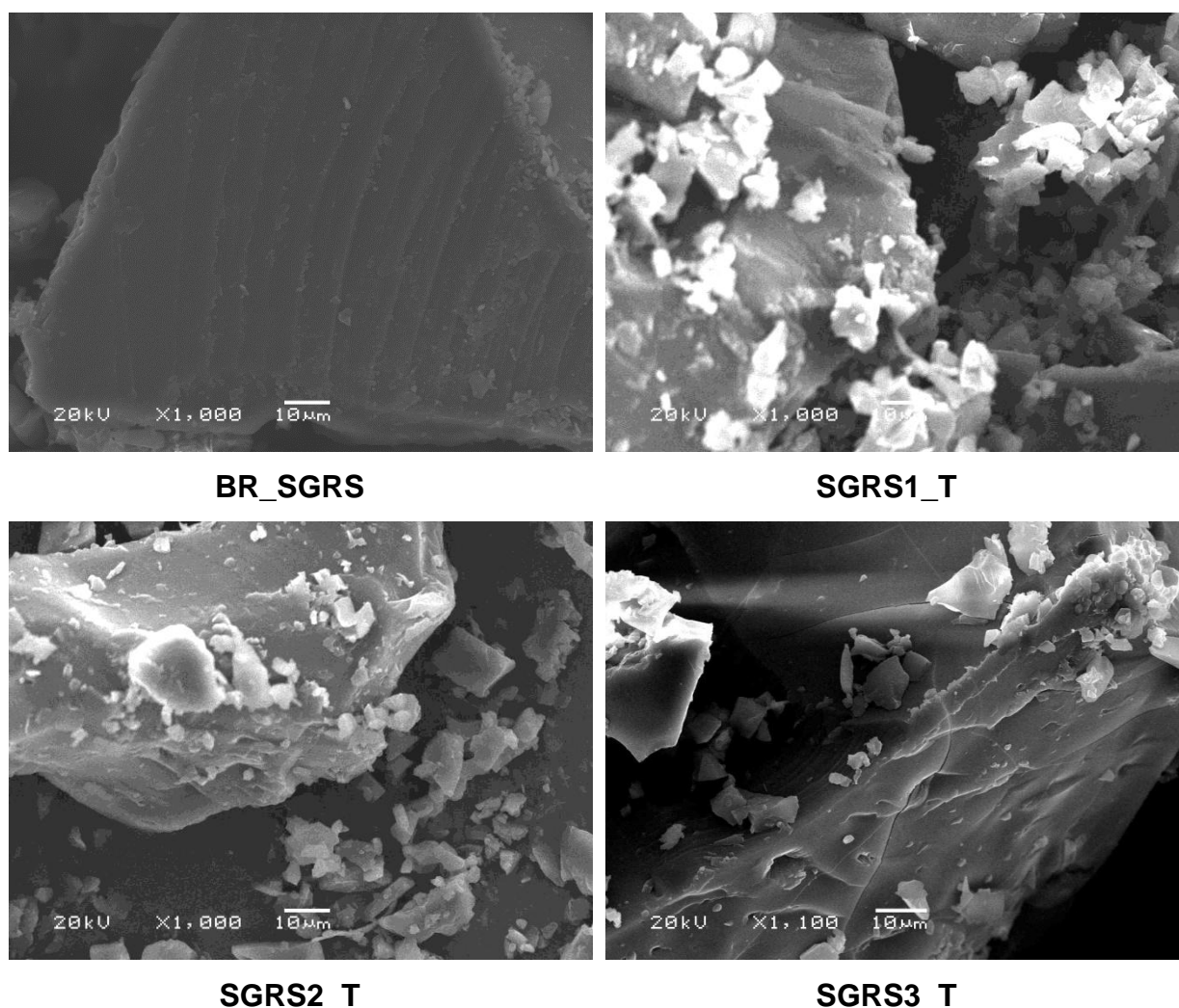


Figura 40 Micrografias obtidas por SEM da sílica pura e para as amostras preparadas por rota silicato (SGRS1_T, SGRS2_T e SGRS3_T)

A textura dos materiais híbridos obtidos por rota silicato caracterizam-se por uma superfície mais lisa que as amostras anteriores com a presença de grãos menores e distribuídos uniformemente na superfície da sílica. A amostra SGRS3_T mostrou uma superfície similar a do tanino puro. As microestruturas são semelhantes nas três amostras e diferem consideravelmente da amostra controle BR_SGRS. Isso pode estar relacionado o fato de ser a síntese que apresentou maior teor de taninos encapsulados.

A Figura 41 mostra a micrografia para os materiais híbridos obtidos por rota não hidrolítica em comparação com a amostra controle BR_SGRNH.

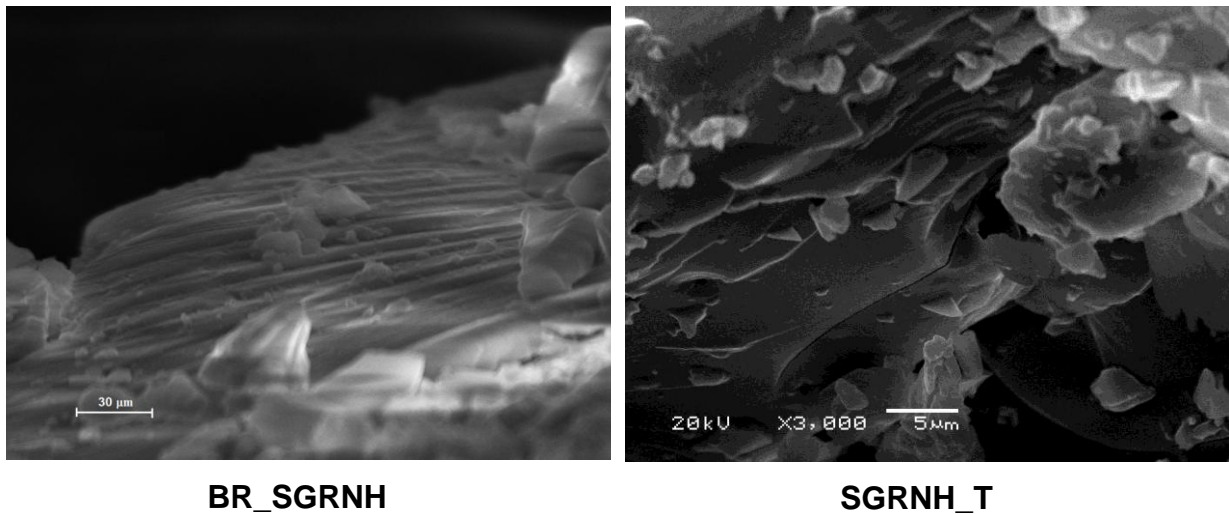


Figura 41 Micrografias obtidas por SEM para a amostra controle BR_SGRNH e do material híbrido SGRNH_T

Nas micrografias das amostras obtidas por rota não hidrolítica observa-se a superfície uniforme da sílica na amostra controle e uma distribuição de grãos de pequeno tamanho na amostra SGRNH_T. Assim como na amostra SGRS3_T observa-se alguma similaridade da superfície do material híbrido com a superfície do tanino puro.

5.1.5 Análise Térmica

Análises termogravimétricas foram realizadas para avaliar o ganho ou perda de resistência térmica dos taninos nos materiais híbridos. Os ensaios dinâmicos foram realizados a partir da temperatura ambiente até 600°C. A Figura 42 mostra o termograma do tanino não encapsulado.

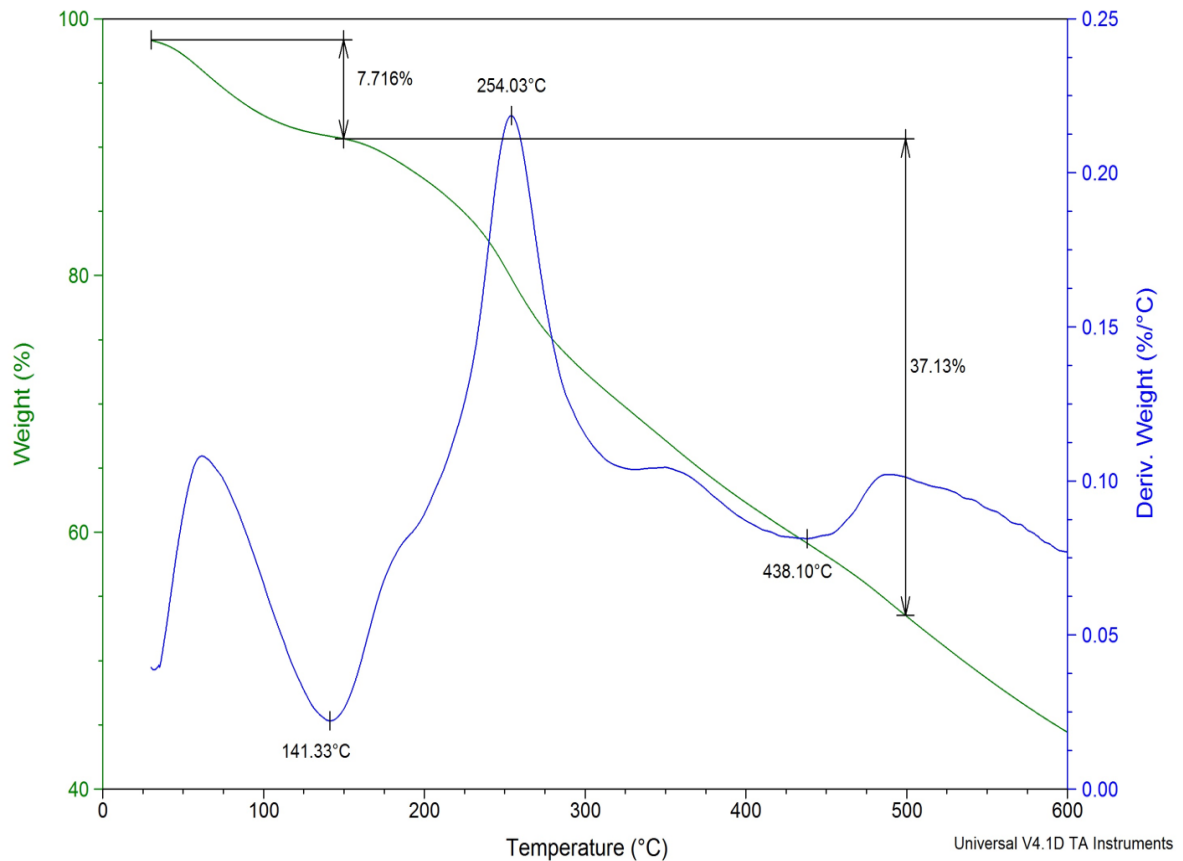


Figura 42 Termograma do tanino não encapsulado

O termograma mostra perda de massa numa faixa de temperatura até 141,3 °C. A partir da faixa de temperatura de 254,0 °C ocorre uma perda de massa do tanino até 600 °C. A curva em azul no termograma indica que a massa diminui com número de eventos diferentes em determinadas faixas de temperatura que terá comportamento diferente conforme a natureza de cada amostra. Foram realizadas análises termogravimétricas para as amostras dos materiais híbridos e dos controles.

A Tabela XIV mostra os valores de temperatura inicial, temperatura máxima, onde se observa a maior perda de massa e o percentual final de perda de massa em comparação com a massa inicial.

Tabela XIV Temperaturas (mínimas e máximas) e percentual de perda de massa dos materiais híbridos obtidos por TGA

| Amostra | T_{inicial} (°C) | T_{máxima} (°C) | perda massa (%) |
|-----------------|---------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| Tanino | 141,3 | 254,0 | 55,6 |
| BR_SGRA | 129,4 | 225,0 | 5,8 |
| SGRA1_T | 108,7 | 346,3 | 23,0 |
| SGRA2_T | 92,6 | 275,0 | 26,9 |
| SGRA3_T | 115,8 | 301,3 | 25,7 |
| SGRA4_T | 111,8 | 296,2 | 29,7 |
| BR_SGRB | 172,8 | 341,7 | 7,7 |
| SGRB1_T | 125,0 | 225,0 | 25,3 |
| SGRB2_T | 164,9 | 241,3 | 26,4 |
| BR_SGRS | 153,5 | 447,2 | 11,3 |
| SGRS1_T | 139,7 | 241,1 | 35,5 |
| SGRS2_T | 175,0 | 354,0 | 49,8 |
| SGRS3_T | 127,0 | 245,6 | 54,3 |
| BR_SGRNH | 122,0 | 357,0 | 8,2 |
| SGRNH_T | 106,0 | 324,5 | 31,5 |

Os valores obtidos de perda de massa percentual entre as amostras controle e os materiais híbridos confirmam a presença dos taninos nos materiais híbridos sintetizados. O tanino não encapsulado perdeu em torno de 55,6% de massa até 600 °C e a maior perda de massa ocorreram em 254 °C.

Considerando a temperatura máxima observada nos termogramas, as rotas ácida e não-hidrolítica conferiram estabilidade térmica aumentando cerca de 8 a 27 % de incremento na estabilidade térmica. A rota básica e a rota silicato não contribuíram para o aumento da estabilidade térmica. O gráfico da Figura 43 mostra as curvas de TGA obtidas para o tanino e para os materiais híbridos SGRA1_T e SGRNH_T.

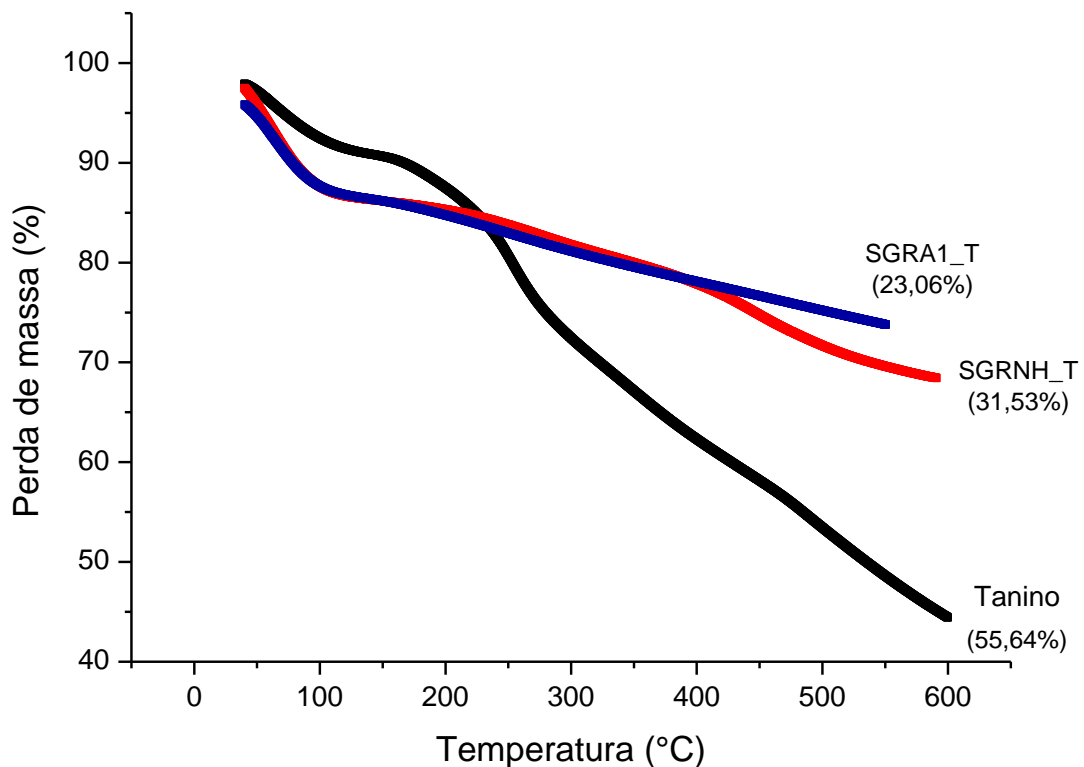


Figura 43 Curvas de perda de massa (%) x Temperatura (°C) obtidas para o tanino e amostras SGRA1_T e SGRNH_T

Os resultados obtidos pela análise termogravimétrica poderão ser avaliados na etapa de aplicação dos materiais híbridos para atender os requisitos necessários de cada processo e considerando as demais características estruturais, morfológicas, texturais e elementares.

5.2 AVALIAÇÕES DE DESEMPENHO DOS MATERIAIS HÍBRIDOS

5.2.1 Ensaio de curtimento e recurtimento de couro

Para avaliação funcional dos materiais híbridos foram realizados dois ensaios: (i) curtimento padrão sobre couro piquelado (depilado e descarnado) e (ii) recurtimento sobre couro Wet blue (pré-curtido ao cromo). Foram testadas as amostras das rotas com melhor rendimento, teor e resposta de cor no envelhecimento: SGRA1_T, SGRA3_T e SGRS3_T, incluindo as respectivas amostras encapsuladas com corante: SGRA1_TC, SGRA3_TC e SGRS3_TC.

Resultados: Amostras SGRA1_T e SGRA1_TC

Após aproximadamente 14 horas de curtimento, a pH 4,30, grande quantidade do material híbrido continuou insolúvel no banho, sendo em maior quantidade para SGRA1_T e menor para SGRA1_TC. Houve uma grande deposição destes sólidos na superfície do couro, provocando uma coloração superficial heterogênea. A amostra SGRA1_T não curtiu, resultando em couro sem enchimento (+1,35 mm), duro e transparente, enquanto a amostra controle, curtida com tanino normal, apresentou bom enchimento (+3,35 mm). A SGRA1_TC também não curtiu, mas teve um incremento de enchimento devido à presença do corante (+2,31 mm), enquanto a amostra controle (curtimento e tingimento padrão) apresentou enchimento adequado (+3,47 mm). Não foi possível visualizar o grau de penetração do corante encapsulado e solidez à luz, pois não houve curtimento no couro. Os resultados obtidos, comparados aos padrões, são mostrados na Figura 44.

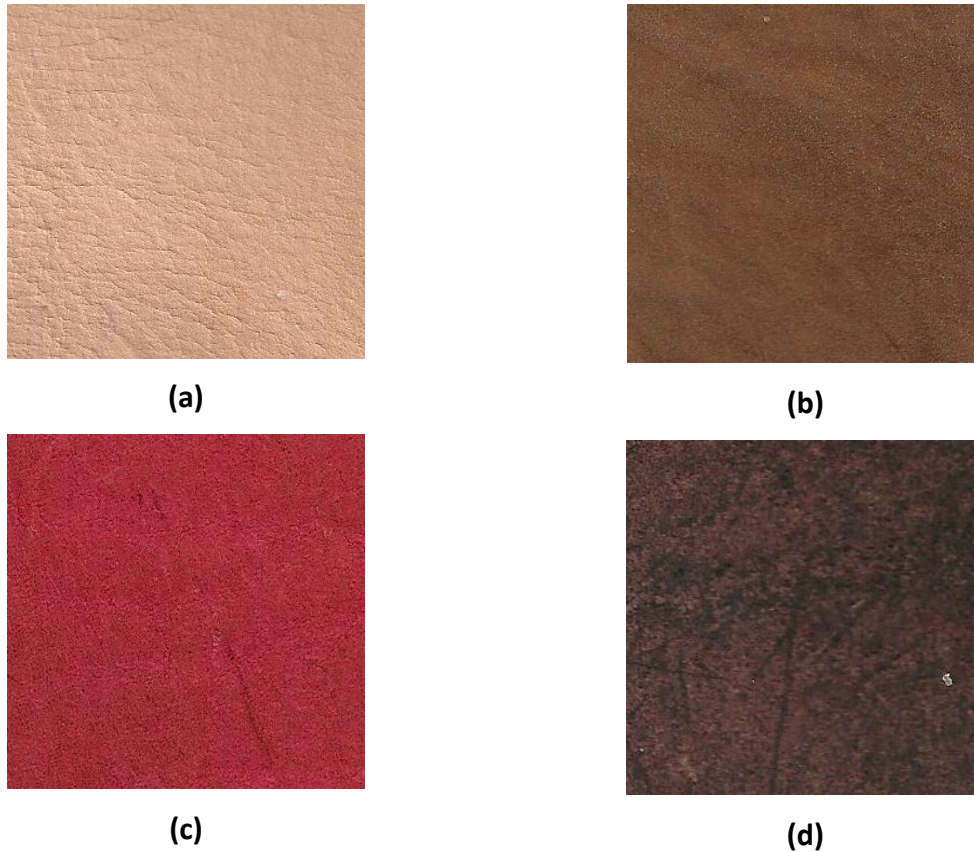


Figura 44 Resultados curtimento couro piquelado (a) Controle tanino (b) SGRA1_T (c) Controle curtimento e tingimento e (d) SGRA1_TC

Resultados: Amostras SGRA3_T e SGRA3_TC

As duas amostras apresentaram curtimento adequado com bom enchimento (+3,47 mm). Os materiais híbridos com corante SGRA3_TC apresentaram diferença de cor em relação ao padrão por diferença de concentração, porém o processo de tingimento simultâneo ao curtimento foi viável. Não foram adicionados produtos auxiliares no teste de curtimento e tingimento simultâneos e, não ocorreu deposição da sílica sobre o couro nem manchas. Os testes de solidez à luz dos couros curtidos com os materiais híbridos foram bastante parecidos com os resultados obtidos das amostras controle apresentando escurecimento em todas as amostras. A avaliação utilizando as escalas de cinza foi de índice 2 (regular) para alteração da cor. Na Figura 45 podemos observar as diferenças entre a parte exposta à luz UV e não exposta de cada material nos testes de solidez.

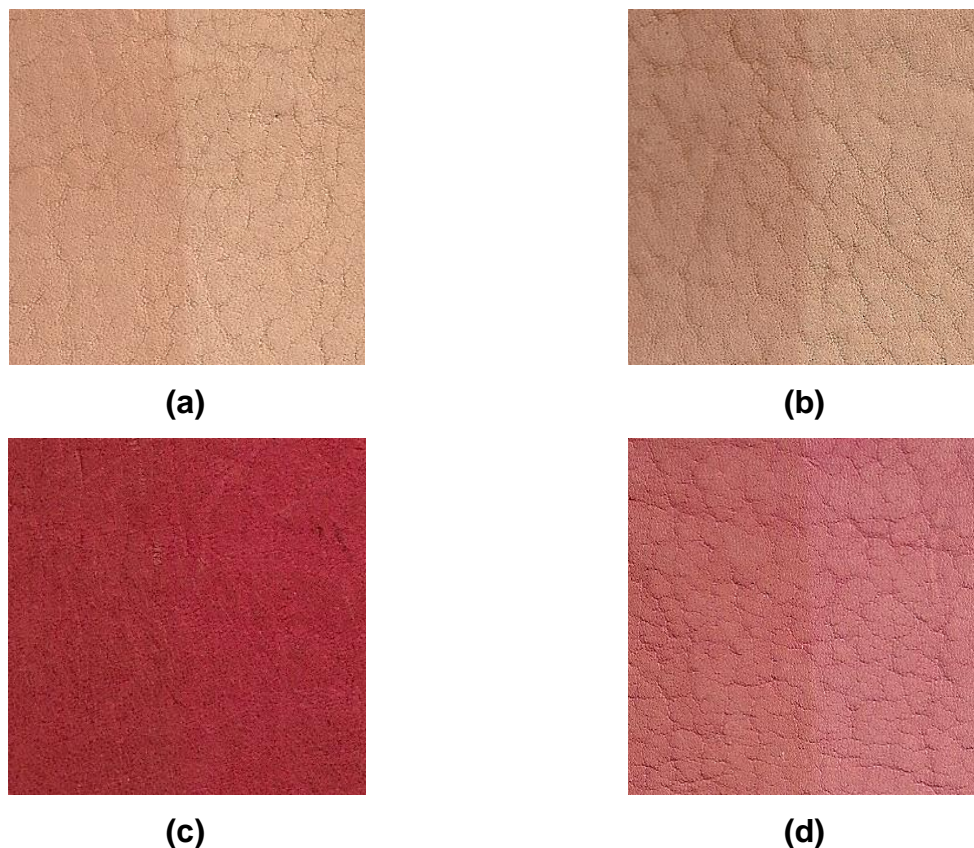


Figura 45 Resultados curtimento couro piquelado (a) Controle tanino (b) SGRA3_T (c) Controle tanino e corante e (d) SGRA3_TC

Resultados: Amostras SGRS3_T e SGRS3_TC

As amostras apresentaram curtimento com boa qualidade apresentando um enchimento de +2,54 mm. Nestes couros observamos uma diferença de intensidade de cor na comparação com os couros curtidos com os taninos não encapsulados. Estas diferenças podem ter ocorrido por diferenças da cor dos taninos utilizados na primeira etapa do processo. No entanto, os ensaios de solidez à luz foram muito satisfatórios com índices na escala de cinzas avaliados em 4-5 (muito bom) para SGRS3_T e índice 4 para SGRS3_TC. Pelos bons resultados, os ensaios foram repetidos com os mesmos híbridos no curtimento e no recurtimento utilizando-se o mesmo tanino dos encapsulamentos. A Figura 46 mostra os resultados obtidos para o curtimento com os materiais híbridos da rota silicato SGRS3_T.

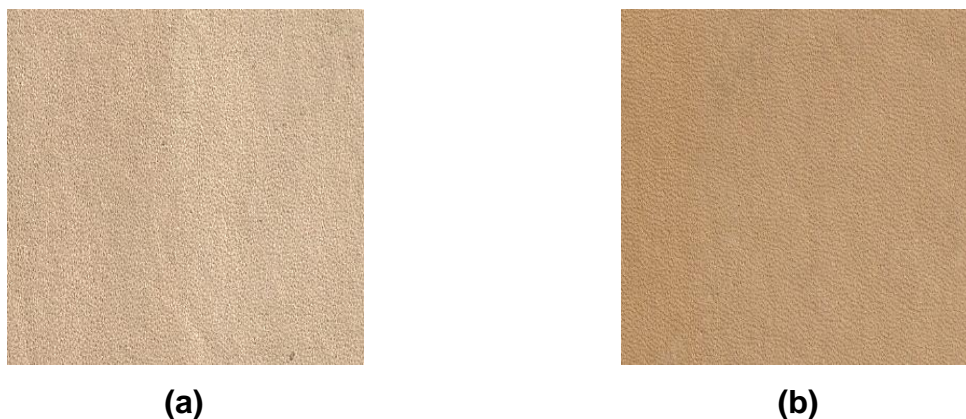


**Figura 46 Resultados curtimento couro piquelado
(a) Controle tanino (b) SGRS3_T**

Observa-se na Figura 46 (b) o tom mais escuro do couro curtido com SGRS3_T em relação ao tanino não encapsulado e a leve diferença entre as duas amostras após a exposição à luz UV. O couro da amostra controle apresentou o mesmo índice das amostras anteriores com índice 2 (regular) para mudança de cor (Fig. 46 (a)), e o couro curtido com a amostra SGRS3_T índice 4-5 (muito bom) (Figura 46 (b)).

Os couros Wet blue recurtidos com o material híbrido SGRS3_T apresentaram os melhores resultados de solidez à luz alcançando índice 5 (excelente) na escala de cinzas, o couro recurtido com tanino não encapsulado teve índice 3-4. Também observamos mudança na intensidade da cor entre as amostras recurtidas com encapsulado, porém também nota-se maior homogeneidade na superfície dos couros.

A Figura 47 mostra os resultados obtidos dos recurtimentos sobre couro Wet blue com taninos não encapsulados e o material híbrido SGRS3_T. Os índices de solidez à luz foram bons para as duas amostras: 4 para a amostra controle (Figura 47 (a)) e 5 para a amostra SGRS3_T (Figura 47 (b)). A mudança na tonalidade do couro Wet blue recurtida com o material híbrido também é observada.



**Figura 47 Resultados recurtimento couro Wet blue
(a) Controle tanino (b) SGRS3_T**

Confirmando os bons resultados obtidos pela escala de cinzas, as amostras foram avaliadas por DRS no sistema CIELab para validação dos índices atribuídos nos ensaios de solidez à luz para as amostras SGRS3_T. A Tabela XV mostra os resultados obtidos no CIELab na comparação antes e depois da exposição à luz das amostras SGRA3_T e SGRS3_T e dos taninos não encapsulados.

Tabela XV Índices de cor (C*), diferença de cor total (ΔE^*) e avaliação final na escala de cinza (Índice de solidez)

| Amostras | C* | ΔE^* | Índice | Valores de Referência NBR 14392:2013 ⁵¹ | |
|--------------|-------|--------------|--------|---|------------------|
| | | | | Índice de solidez | Diferença CIELab |
| Tanino (C) | 22,01 | 5,77 | 2 | 5 | 0 ± 0,2 |
| Tanino (R) | 21,35 | 2,65 | 3 - 4 | 4 - 5 | 0,8 ± 0,2 |
| | | | | 4 | 1,7 ± 0,3 |
| SGRA3_T (C) | 19,86 | 3,68 | 3 | 3 - 4 | 2,5 ± 0,35 |
| SGRA3_TC (C) | 20,00 | 2,25 | 3 - 4 | 3 | 3,4 ± 0,4 |
| | | | | 2 - 3 | 4,8 ± 0,5 |
| SGRS3_T (C) | 18,92 | 0,62 | 4 - 5 | 2 | 6,8 ± 0,6 |
| SGRS3_T (R) | 19,02 | 0,13 | 5 | 1 - 2 | 9,6 ± 0,7 |
| SGRS3_TC (C) | 22,10 | 2,00 | 4 | 1 | 13,6 ± 1,0 |

C: curtimento; R: recurtimento; C*: cor; ΔE^* : diferença de cor total

Dos resultados obtidos pelo conjunto de testes podemos concluir que as amostras SGRA1_T e SGRA1_TC, devido as suas características estruturais como microporosidade ($S_{\text{BET}} = 86,3 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, $D_p = 28,5 \text{ \AA}$ e $c_{\text{BET}} = 835$), baixo teor de taninos encapsulados (< 41%), dificultaram a liberação dos taninos nos processos de curtimento e recurtimento repetindo os resultados dos testes de lixiviação (~ 10%), não foram funcionais pois não interagiram com a proteína do couro. Nos curtimentos e recurtimentos vegetais, outros fatores podem influenciar no processo como o ponto isoelétrico, difusão e fixação dos taninos. No entanto, no caso destes materiais híbridos, a não liberação dos taninos é que provavelmente impediu o curtimento e recurtimento dos couros. Os materiais híbridos SGRA3_T e SGRS3_T apresentaram melhores resultados devido ao maior teor de taninos encapsulados de 41 e 76%, respectivamente e, melhor lixiviação em meio aquoso (~ 43%).

Em processos de curtimento vegetal, a concentração de taninos pode variar de 40 a 100 % spm (sobre o peso de material) conforme as características que se deseja obter do couro e sua aplicação final e esses banhos geralmente são reaproveitados para iniciar novos processos (reciclo). Nos ensaios foi utilizada a concentração de 45 % spm de taninos. Pelo teor de taninos encapsulados nos materiais híbridos (41 a 76%), uma economia média de 40% de taninos foi observada e após os processos ainda havia taninos disponíveis nos banhos para o reciclo. As amostras encapsuladas com taninos e corantes propiciaram a economia de água suplementar por termos realizado o curtimento e tingimento simultâneos, no mesmo banho.

Os melhores índices de solidez à luz apresentados pelas amostras SGRS3_T podem estar relacionados ao tipo de síntese sol-gel e o uso de biftalato de potássio que preservou o tanino durante o encapsulamento favorecendo a atividade funcional do material híbrido no curtimento e recurtimento. De alguma forma, o processo sol-gel baseado na rota silicato reduziu a formação de quinonas e elementos que promovam a oxidação e auto-oxidação dos taninos após aplicação nos couros. Estes materiais híbridos já haviam apresentado melhores resultados que os taninos puros na avaliação de escurecimento após seis meses da síntese, mostrando maior estabilidade.

5.2.2 Ensaios Antimicrobianos

Os materiais híbridos foram testados como antimicrobianos seguindo a metodologia descrita no item 4.4.4 e forneceram os resultados apresentados na Tabela XVI.

Tabela XVI Zona de inibição (mm) incluindo o diâmetro do disco das atividades dos materiais híbridos e controles

| Microorganismo | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642 | <i>Candida sp.</i> ATCC 34147 (Levedura) |
|----------------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|--|
| Amostra | (Gram +) | (Gram -) | (Fungo filamentoso) | |
| Tanino puro | 24,2 ± 0,1 | - | 11,11 ± 0,38 | 10,67 ± 0,68 |
| SGRA1_T | - | - | - | - |
| SGRA2_T | - | - | - | - |
| SGRA3_T | 14,5 ± 0,5 | 12,89 ± 0,4 | - | - |
| SGRA4_T | 11,0 ± 0,3 | 10,50 ± 0,7 | - | - |
| SGRB1_T | - | - | - | - |
| SGRB2_T | 9,33 ± 0,3 | - | - | - |
| SGRS1_T | 14,0 ± 0,9 | - | - | - |
| SGRS2_T | 11,2 ± 0,5 | - | - | - |
| SGRS3_T | 17,0 ± 0,8 | - | 14,2 ± 0,5 | 14,7 ± 0,6 |
| SGRNH_T | 16,5 ± 0,5 | - | - | - |
| Cloranfenicol | 23,22 ± 3,10 | 25,56 ± 1,90 | - | - |
| Gentamicina | 17,89 ± 1,54 | 16,56 ± 1,64 | - | - |
| Ampicilina | 25,67 ± 2,03 | 20,44 ± 1,71 | - | - |

Ensaios dos antibiogramas bacterianos conduzidos em triplicata. Microorganismo sensível ao teste, resultados expressos como média ± desvio padrão em mm. Microorganismo resistente ao teste, representado com sinal (-). Teste não realizado (nr). Graus de inibição de referência: >18 mm: forte; 14 -18 mm: moderada; 10 – 13 mm: fraca; (-) inibição não detectada.

As espécies bacterianas são diferenciadas pela morfologia, pela composição química, pelas necessidades nutricionais, pelas atividades bioquímicas e pela fonte de energia. Os compostos fenólicos exercem atividade antimicrobiana lesando as membranas plasmáticas, inativando as enzimas e desnaturando as proteínas. Assim, os testes consistiram de medir esta atividade em bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos filamentosos e leveduras ⁷². O tanino não encapsulado apresentou ação antimicrobiana para três microorganismos testados: *S. aureus* (forte), sendo mais efetivo que os antibióticos Cloranfenicol e Gentamicina em relação ao diâmetro dos halos. Para os microorganismos *A. niger* e *Candida sp.* apresentou uma inibição fraca porém, nenhum dos antibióticos testados apresentou atividade frente a estes microorganismos.

O patógeno alimentar *E.coli* possui forte carga negativa na sua membrana externa o que é um fator importante como componente de defesa do microorganismo repelindo e evitando a ação de agentes antimicrobianos. Pelas análises de Potencial Zeta realizadas, todos os materiais híbridos e os taninos puros, com exceção da amostra SGRA4_T, possuem carga negativa de superfície o que justifica a não atividade antimicrobiana para *E.coli*. Em contrapartida a amostra SGRA4_T (PZ = $7,4 \pm 0,342$) apresentou atividade fraca para este microorganismo, assim como a amostra SGRA3_T. Nos dois materiais híbridos, a inserção dos metais: potássio ($KHC_8H_4O_4$) em SGRA3_T e alumínio ($AlCl_3$) em SGRA4_T nas sínteses sol-gel podem ter atuado na inibição desestabilizando a estrutura de proteínas da membrana (porinas) e permitido a ação antimicrobiana dos taninos liberados dos materiais híbridos.

As amostras SGRA1_T, SGRA2_T e SGRB1_T não apresentaram nenhum resultado antimicrobiano em todos os testes. Para bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*), os materiais híbridos apresentaram fraca inibição nas amostras: SGRA4_T, SGRB2_T e SGRS2_T e atividade com inibição moderada nas amostras: SGRA3_T, SGRS1_T, SGRS3_T e SGRNH_T. Nos testes com fungos filamentosos (*A. niger*) e leveduras (*Candida sp.*), os materiais híbridos SGRS3_T apresentaram atividade moderada com maior diâmetro de inibição que os taninos não encapsulados.

Como condição da metodologia aplicada, todos os materiais foram diluídos em soluções de 5 mg/L sendo adicionado nos discos de 9 mm, 25 μ L desta solução. Deve ser observado que os materiais híbridos apresentaram teores diferentes para

cada rota e, portanto devemos avaliar a eficiência dos materiais híbridos frente aos antibióticos utilizados nos controles. Os taninos não encapsulados apresentaram atividade para *S. aureus* melhor que a gentamicina e foi ativo para *A. niger* e *Candida* sp., que apresentaram resistência aos antibióticos. A amostra SGRNH_T com teor de taninos em torno de 28% apresentou atividade moderada para *S. aureus* ($16,5 \pm 0,5$), valores próximos aos obtidos pela gentamicina ($17,0 \pm 0,8$) apesar do baixo percentual apresentado nos ensaios de lixiviação ($< 10\%$), a presença residual de Fe pode ter atuado nesta atividade. A atividade observada para as amostras obtidas por rota silicato SGRS3_T, com teor de taninos em torno de 76% para os três microorganismos, pode estar diretamente relacionada com a maior concentração de taninos nestes materiais híbridos.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou o potencial da utilização de métodos sol-gel para o encapsulamento de taninos de *Acacia mearnsii* por diferentes rotas. As características elementares, estruturais, texturais e morfológicas dos materiais híbridos gerados foram diferentes para cada rota sol-gel.

A rota de encapsulamento afeta nitidamente as características texturais e estruturais dos materiais híbridos gerados. A rota básica parece afetar a natureza do tanino durante a síntese gerando materiais inativos em termos de atividade antimicrobiana ou de processos de curtimento em couro. A rota ácida, embora gere materiais com teores relativamente elevados de tanino, a textura final dos materiais encapsulados sugere dificuldades na liberação desses compostos, que por sua vez, compromete sua performance em testes de atividade antimicrobiana ou de curtimento de couro. Finalmente, os melhores resultados são atingidos pela rota sol-gel silicato que permitiu bons rendimentos de síntese, preservação do tanino durante o processo sol-gel e textura adequada para liberação controlada dos ativos. As características elementares, estruturais, texturais e morfológicas dos materiais híbridos gerados pela rota silicato garantiram excelentes resultados nos ensaios de curtimento e recurtimento assim como foi a única a repetir o bom desempenho antimicrobiano dos taninos puros apresentando inibição para bactérias Gram positivas, fungos filamentosos e leveduras.

Os materiais híbridos incorporados com corantes orgânicos e taninos foram funcionais e não interferiram no potencial de curtimento dos taninos indicando a possibilidade da incorporação de outros agentes de acabamento que possam reduzir os tempos de processo além de economia de água e outros insumos.

Este trabalho, portanto, investigou e avaliou as potencialidades e limitações do emprego do processo sol-gel no encapsulamento de taninos de *Acacia mearnsii*. As limitações apresentadas por algumas das amostras podem ser revisadas pela versatilidade dos processos sol-gel que permitem a modificação e adequação do processo para preservação dos taninos como observado nos resultados obtidos pela rota silicato.

Em suma, o encapsulamento dos taninos pelo método sol-gel promoveu um controle na liberação dos taninos em meio aquoso, o que reduz as perdas por hidrólise e maior aproveitamento de suas propriedades.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BECHTOLD, T.; MUSSAK, R. (Editors). *Handbook of Natural Colorants*. John Wiley & Sons Ltd, p 201, 2009.
- [2] QUIDEAU, S. et al. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chem. Int.*, 50, p. 586-621, 2011.
- [3] LATIF, M.A. Bark, a potential source of useful products. *The Pakistan Journal of Forest*, Pakistan, v.16, n.2, p. 172-175, 1966.
- [4] CRONQUIST, A. The evolution and classification of flowering plants. 2^a Edition New York Botanical Garden, Bronx, 1988.
- [5] BELGACEM, M.N.; GANDINI, A. Editors. Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources. *Elsevier 's Science & Technology*, 1^a Ed., 2008.
- [6] HASLAM, E. *Practical Polyphenolics – From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action*, Cambridge University Press, Cambridge, 1998.
- [7] MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P; ARAÚJO, E.L. Taninos: Uma abordagem química à ecologia. *Química Nova*, Vol. 28, No. 5, 892-896, 2005.
- [8] VENTER, P.B.; et al. Analysis of commercial proanthocyanidins. Part 3: The chemical composition of wattle (*Acacia mearnsii*) bark extract. *Phytochemistry*. <http://dx.doi.org/10.1016/phytochem.2012.07.012>, 2012.
- [9] COVINGTON, A.D. Modern Tanning Chemistry. *Chemical Society Reviews*, p.111-126, Disponível em: <http://pubs.rsc.org> doi:10.1039/CS9972600111, 1997.
- [10] VERONESE. *Food Ingredients Brasil*, n° 19. Disponível em: www.revista-fi.com, 2011.
- [11] CORAL, L.A et al. Estudo da Viabilidade de Utilização do Polímero Natural (TANFLOC) em Substituição ao Sulfato de Alumínio no Tratamento de Águas para Consumo. *2nd International Workshop | Advances in Cleaner Production*, São Paulo, Brazil, 2009.
- [12] PONCET-LEGRAND, C.; CABANE, B.; BAUTISTA-ORTÍN, A.B. ; CARRILO, S. ; FULCRAND, H. ; PÉREZ, J. ; VERNHET, A. Tannin oxidation: Intra-versus intermolecular reactions. *Biomacromolecules*, Vol.11(9), pp.2376-2386, 2010.
- [13] SCALBERT, A. Antimicrobial Properties of Tannins. Review article number 63. *Phytochemistry*, vol. 30, n° 12, pp. 3875-3883, 1991.
- [14] COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 12, n°4, p. 564-582, 1999.

- [15] MARTIN, J.G.P.; PORTO, E.; CORREA, C.B.; ALENCAR, S.M.; GLORIA, E.M.; CABRAL, I.S.R.; AQUINO, L.M. Antimicrobial potential and chemical composition of agro-industrial wastes. *Journal of Natural Products*, v. 5, p. 27-36, 2012.
- [16] CHANA-THAWORN, J.; CHANTHACHUM, S.; WITTAYA, T. Properties and antimicrobial activity of edible films incorporated with kiam wood (*Cotyleobium lanceotatum*) extract. *LWT Food Science and Technology*, 44, p. 284-292, 2011.
- [17] SILVA, M.J.D.; ENDO, L.H.; DIAS, A.L.T.; SILVA, G.A.; SANTOS, M.H.; SILVA, M.A. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Mimosaceae). *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, 33(2), p. 267-274, 2012.
- [18] ARBOS, K.A.; STEVANI, P.C., CASTANHA, R.F. Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga. *Rev. Ceres*, Viçosa, v.60, p. 161-165, 2013.
- [19] BO LEI; XIAOFENG CHEN; XUE HANA; ZHENGMAO LIA. Unique physical-chemical, apatite-forming properties and human marrow mesenchymal stem cells (HMSCs) response of sol-gel bioactive glass microspheres. *J. Mater. Chem.*, n. 21, 12725, 2011.
- [20] SHU-XIA XU; JIA-LING LI; ZHI-LING ZHOUA; CHENG-XIAO ZHANG. A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized by sol-gel thin film on a multi-wall carbon nanotube modified electrode. *Anal. Methods*, n. 6, p. 6310-6315, 2014.
- [21] YUKI KAWACHI; SHIN-ICHI KUGIMIYA; HITOMI NAKAMURA; KATSUYA KATO. Enzyme encapsulation in silica gel prepared by polylysine and its catalytic activity. *Applied Surface Science*, n. 314, p. 64-70, 2014.
- [22] RĂILEANU, M.; TODAN, L.; VOICESCU, M.; CIUCULESCU, C.; MAGANU, M. A way for improving the stability of the essential oils in an environmental friendly formulation. *Materials Science and Engineering*, C 33, p. 3281-3288, 2013.
- [23] IUPAC, International Union for Pure and Applied Chemistry. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 79, No. 10, pp. 1801-1829, 2007.
- [24] ZUB, Y.L.; CHUIKO, A.A. Synthesis, Structure and Adsorption Properties of Functionalized Polysiloxane Materials. Institute of Surface Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine. In: J.M. Loureiro and M.T. Kartel (eds.), *Combined and Hybrid Adsorbents*, 3-21, Springer, 2006.
- [25] SAKKA, S. (Ed). *Handbook of Sol-Gel Science and Technology. Processing Characterization and Application*, Kluwer Acad. Publish., Boston/Dordrecht/London, 2005.
- [26] ILER, R.K. *The Chemistry of Silica Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry*, 1979.

- [27] BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. *Sol-Gel Science: the physics and chemistry of sol-gel processing*, Academic Press: San Diego, 1990.
- [28] VIOUX, A.; MUTIN, P.H. *Non-Hydrolytic Sol-Gel Technology*. In: *Handbook of Sol-Gel Science and Technology Processing, Characterization and Applications*, vol.1, p.621-637, 2004.
- [29] DEBECKER, D.P.; MUTIN, P.H. Non-hydrolytic sol-gel routes to heterogeneous catalysts. *Chem. Soc. Rev.*, 41, p.3624–3650, 2012.
- [30] VANSANT, E.F.; VAN DER VOORT, P.; VRANCKEN, K.C. (Editors). *Studies in Surface Science and Catalysis*, vol. 93, p. 3-556. ISBN: 978-0-444-81928-4 1995.
- [31] BENVENUTTI, E.V.; MORO, C.C.; COSTA, T.M.H.; GALLAS, M.R. Materiais Híbridos à base de sílica obtidos por método Sol-Gel. *Quim. Nova*, vol.32, n° 7, p. 1926-1933, 2009.
- [32] KANDIMALLA, V.B.; TRIPATHI, V.S.; JU, H. Biosensors based on immobilization of biomolecules in sol-gel matrices. Em: *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications*, cap. 16, Academic Press, Inc., 2008.
- [33] COPELLO, G.J. et. al Polyphenol–SiO₂ hybrid biosorbent for heavy metal removal. Yerba mate waste (*Ilex paraguariensis*) as polyphenol source: Kinetics and isotherm studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 102, 218– 226, 2013.
- [34] BERGNA, H.E.; ROBERTS, W.O. (Editors) *Colloidal Silica: Fundamentals and Applications*, CRC Press. ISBN: 978-0-8247-0967-9, 2006.
- [35] MUTIN, P.H.; VIOUX, A. Nonhydrolytic Processing of Oxide-Based Materials: Simple Routes to Control Homogeneity, Morphology, and Nanostructure. *Chem. Mater.*, 21, 582–596, 2009.
- [36] C.I.E., COMMISSION INTERNATIONALE de l'ECLAIRAGE: Recommendations on Uniform Colour Spaces, Colour Difference Equations, and Metric Colour Terms, Supplement No. 2 to Publication No. 15, *Bureau Central de la CIE*, Paris, 1976.
- [37] C.I.E., COMMISSION INTERNATIONALE de l'ECLAIRAGE: Colorimetry, Official Recommendations of the International Commission on Illumination, 2nd ed., Publication CIE No. 15.2(TC-3.1), *Bureau Central de la CIE*, Paris, 1985.
- [38] FAIRCHILD, M.D. *Color Appearance Models* (Second Edition) Munsell Color Science Laboratory Rochester Institute of Technology, USA, 2005.
- [39] IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry. Reporting physisorption data for gas/solid systems (Recommendations 1984). Printed in Great Britain. *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 57, No. 4, pp. 603—619, 1985.
- [40] CULLITY, B.D.; *In elements of X-Ray Diffraction*. Wesley publishing Co., 1980.

- [41] ILAVSKY J, JEMIAN P.R. Irena: tool suite for modeling and analysis of small angle scattering. *J Appl Crystallogr* 42:347–353, 2009.
- [42] BEAUCAGE G. Approximations leading to a unified exponential/power-law approach to small-angle scattering. *Appl Crystallogr* 28:717–728, 1995.
- [43] BEAUCAGE G. Small-angle scattering from polymeric mass fractals of arbitrary mass-fractal dimension. *Appl Crystallogr* 29:134–146, 1996.
- [44] GUINIER, A.; FOURNET, G. *Small-angle scattering of X-rays*. 2 Ed. Wiley: New York, 1955.
- [45] BALE, H.D.; SCHMIDT, P.W. *Physical Review Letters*, v. 53, p. 596-599, 1984.
- [46] PUTNAM, C.D.; HAMMEL, M.; HURA, G.L.; TAINER, J.A. X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Quarterly Reviews of Biophysics*, n. 40, pp. 191–285, 2007.
- [47] R.J. Hunter, *Zeta Potential in Colloid Science*, first ed., Academic Press, New York, 1981.
- [48] ZETASIZER Nano Series User Manual. © *Malvern Instruments Ltd*. 2003, 2004
- [49] TRIPATHY, T.; RANJAN DE, B. Flocculation : A New Way to Treat the Waste Water. *Journal of Physical Sciences*, vol. 10, p. 93 – 127, 2006.
- [50] JAGAJJANANI RAO, K.; PARIJA, S. Green synthesis of silver nanoparticles from aqueous *Aegle marmelos* leaf extract. *Materials Research Bulletin* 48, 628–634, 2013.
- [51] ABNT NBR 14730 Couro – Determinação da solidez da cor com lâmpada de ultravioleta. Escala de Cinza (ISO 105 – A02), 2001. Cancelada em 21/02/2013, substituída por: ABNT NBR 14392:2013 Calçados e componentes. Determinação da solidez (estabilidade) da cor à luz natural, ao calor, ao calor após exposição à luz e com lâmpada de ultravioleta, 2013.
- [52] CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI* (antigo NCCLS) *Manual*. Disponível em: www.anvisa.gov.br, 2007.
- [53] CAPELETTI, L.B.; SANTOS, J.H.Z.; MONCADA, E. Quantification of indicator content in sílica -based pH solid sensors by diffuse reflectance spectroscopy. *Anal. Methods*, 3, 2416, 2011.
- [54] KARDEL, M.; TAUBE, F.; SCHULZ, H.; SCHÜTZE, W.; GIERUS, M. Different approaches to evaluate tannin content and structure of selected plant extracts – review and new aspects. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 86, 154-166, 2013.

- [55] BRAGHIROLI, F.; FIERRO, V.; PIZZI, A.; RODE, K.; RADKE, W.; DELMOTTE, L.; PARMENTIER, J.; CELZARD, A. Reaction of condensed tannins with ammonia. *Industrial Crops and Products*, n. 44 p. 330– 335, 2013.
- [56] SCHANDA, J. Editor. *Colorimetry: understanding the CIE system*. Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA. Disponível em: www.wiley.com, 2007.
- [57] PADDOCK, S. W. Confocal Laser Scanning Microscopy. *BioTechniques*, 27:992-1004, 1999.
- [58] OLIVEIRA, O.W.; ROS PETROVICK, P. Spray drying of plant extracts: basic remarks and application. *Rev. Bras. Farmacogn.* Vol.20 n.4, Curitiba, 2010.
- [59] EDELMANN, A.; LENDL, B. Toward the optical tongue: Flowthrough sensing of tannin-protein interactions based on FTIR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* 124(49):14741-14747, 2002.
- [60] SOCRATES, G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*. Wiley: Chichester, UK, ed. 3^a, 2001.
- [61] POUCHERT, C.J. (Ed.) *The Aldrich Library of Infrared Spectra*. 3^a Ed. Wisconsin. Aldrich Chemical Company, 1991.
- [62] SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. *Identificação Espectroscópica dos Compostos Orgânicos*. 6^a Ed. Guanabara-Koogan, 1998.
- [63] COLTHUP, N.B.; DALY, L.H.; WIBERLEY, S.E. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. 3rd, Academic Press Inc., 1990.
- [64] ALMEIDA, R.M. *Handbook of sol-gel science and technology: processing, characterizations and applications*, vol. II: Characterization of sol-gel materials and products, New York: Kluwer Academic Press, 2004.
- [65] FIDALGO, A.; ILHARCO, L.M. Chemical tailoring of porous silica xerogels: Local structure by vibrational spectroscopy. *Chem. Eur. J.* , p.392-398, 2004.
- [66] FIDALGO, A.; CIRIMINNA, R.; ILHARCO, L.M.; PAGLIANO, M. *Chemistry of Materials*, n.17, p. 6686-6694, 2005.
- [67] NAKAJIMA, N.; OHE, K.; BABA, Y.; KIJIMA, T. *Anal. Sci.* v.19, p.1075, 2003.
- [68] HEMINGWAY, R.W.; KARCHESY, J. J.; BRANHAM, S.J. (Editors). *Chemistry and significance of Condensed Tannins*, 538p, Plenum Press, New York, 1989.
- [69] www.chemspider.com, acesso em: 01/09/2014.
- [70] www.cienciadosmateriais.org, acesso em: 01/09/2014.

[71] KUILA, U.; PRASAD, M. Specific surface area and pore-size distribution in clays and shales. *Geophysical Prospecting*, vol.61, p. 341-362, 2013.

[72] TORTORA, G.J. et.al *Microbiologia*, 6ª Ed. Editora Artmed, 2003.