Absorción y fijación de los taninos vegetales con respecto al colágeno

Franciela Spier[1], Wagner F. Fuck[1], Manuel Antonio Chagas Jacinto[2], Mariliz Gutterres[1]

[1]Laboratory forLeather and Environmental Studies (LACOURO),Chemical Engineering Post-graduate Program (PPGEQ), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Luiz Englert s/n°, Porto Alegre-RS,Brazil, 90040-040, (51)3308-3954, franciela@ibest.com.br, mariliz@enq.ufrgs.br

[2]Leather laboratory of the Embrapa Livestock Southeast, Rodovia Washington Luiz, km 234, CEP 13.569-706 São Carlos, SP, Brazil, +55 16 3411-5693, manuel.jacinto@embrapa.br.

Resumen

En el proceso de transformación de piel animal en bruto en cuero acabado, la piel, que es susceptible a la putrefacción, se estabiliza. El creciente interés por las tecnologías limpias y las exigencias ambientales ha llevado a los curtidores a incrementar sus esfuerzos para desarrollar agentes de curtición sin cromo. Entre las diversas opciones de curtición, la curtición al vegetal es un método tradicional y reconocible el cual, asociado con algunas propiedades físico-químicas, proporciona al cuero características únicas, conservando los defectos naturales y las marcas.

Como material orgánico biodegradable, también es respetuoso con el medio ambiente. Los taninos vegetales son mezclas complejas con acción curtiente debido a su concentración en sustancias fenólicas que reaccionan con materiales de colágeno. El objetivo de este estudio es investigar la capacidad del sustrato de colágeno de la piel para absorber y fijar taninos vegetales de acacia mearnsii a diferentes pH, mediante el uso de métodos analíticos y experimentales especiales. En sustratos como el colágeno en polvo, sustancia piel en polvo y pieles bovinas en bruto, se examinó la influencia del pH y de la oferta de taninos sobre la absorción y fijación del tanino vegetal de acacia. El contenido de tanino absorbido se determinó por espectroscopia UV-visible y por la diferencia en el contenido de sólidos suspendidos antes y después de la curtición. Los análisis del potencial zeta permitieron elucidar las condiciones del proceso de curtido.

Palabras clave: absorción de taninos, espectrofotometría, potencial zeta.

1. Introducción

Después del pelambre, las pieles son susceptibles al ataque de bacterias y microorganismos. La estructura del colágeno de las pieles debe estabilizarse mediante el proceso de curtición para evitar su degradación. De los procesos de curtición existentes, la curtición al cromo es la más utilizada en la industria del cuero, ya que las pieles adquieren excelentes propiedades físicas y organolépticas. Aproximadamente el 90% de los procesos de curtición a nivel industrial se realizan con sales de cromo (III) (Marsal et al., 2012). Sin embargo, la curtición al cromo tiene sus propias desventajas. El cromo y otros contaminantes inorgánicos contaminan el aire y el agua (Kolomaznik et al., 2008). En Brasil, los residuos de cuero que contienen cromo se consideran residuos peligrosos (Clase I) y deben ser gestionados a través de vertederos especiales. Por lo tanto, la investigación se ha concentrado cada vez más en alternativas a la curtición al cromo. Entre los innumerables sistemas alternativos de curtición actualmente explotados, los taninos vegetales son una de las opciones más prometedoras. Los taninos vegetales son materiales naturales considerados como una opción ecológica adecuada para reemplazar el cromo (D'aquino et al., 2004). El desarrollo de estas tecnologías de curtido requiere un mayor uso de taninos de origen orgánico, basados en taninos vegetales (ONEM et al., 2014), aunque se combinan con otros curtientes de base fenólica, aldehídos, silicatos, fosfatos, entre otros (Krishnamoorthy et al., 2012). Además, se debe desarrollar la

recuperación de residuos mediante la tecnología apropiada para promover la eliminación adecuada de estos materiales.

Los taninos se definen como polifenoles de origen natural solubles en agua, de peso molecular entre 500 y 20.000 Da, que difieren de la mayoría de los otros compuestos fenólicos naturales en su capacidad para formar complejos insolubles en agua con proteínas, polisacáridos y alcaloides. Esta reactividad particular con las proteínas se denomina astringencia y es la base para su uso en la industria del curtido (Khanbabaee y Ree, 2001). Los taninos están muy extendidos en el reino vegetal (pteridófitas, gimnospermas y angiospermas) y se encuentran en hojas, frutas, corteza y madera; y pueden acumularse en grandes cantidades en determinados órganos o tejidos de la planta (Haslam, 1989). Presentan un gran valor en las interacciones entre la planta y su ecosistema, ejercitando por ejemplo, el papel fagoinhibidor contra los herbívoros o como agentes antimicrobianos. Los taninos se consideran sustancias vegetales secundarias, ya que no están implicados en las vías metabólicas. Como metabolitos secundarios, los taninos son compuestos fenólicos de gran interés económico y ecológico (Monteiro et al., 2005).

Los taninos, según su estructura y sus propiedades; pueden clasificarse como taninos hidrolizables y taninos condensados (Adamczyk et al., 2011). Los taninos hidrolizables se componen de ésteres del ácido gálico o del ácido elágico, galotaninos y elagitaninos respectivamente, con un núcleo de azúcar que suele ser glucosa, y son fácilmente hidrolizados por ácidos o enzimas en productos monoméricos (Falcão y Araújo, 2013). Por lo tanto, los componentes básicos de los taninos son azúcares, ácido gálico, ácido elágico y flavonoides (LEMMENS & WULIJARNI-SOETJIPTO, 1991). Los taninos condensados, también conocidos como proantocianidinas poliméricas, están compuestos de unidades de flavonoides y generalmente son más abundantes en la corteza de los árboles y maderas que sus homólogos hidrolizables (Bhat et al., 1998). Las fuentes de taninos son muy variadas. Para las estructuras hidrolizadas y condensadas, las especies ricas en taninos son muchas. Notables por su importancia económica e industrial son el zarzo negro o la corteza de la mimosa negra (Acacia mearnsii), la madera de Quebracho (Schinopsis balansae), la corteza de roble (Quercus spp.), la madera de castaño (Castanea sativa), la madera de manglar, el divi-divi (Caesalpina coraria), la algarrobilla chilena, la tara y la corteza de varias especies de pinos y abetos, sin contar aún más otras plantas con taninos extraíbles (Pizzi, 2008).

En este contexto, el objetivo del presente trabajo de centra en investigar la capacidad del colágeno de la piel para absorber y fijar los taninos vegetales de la acacia mearnsii a diferentes pH, a través del uso de métodos analíticos y experimentales especiales.

2. Materiales y métodos

Se evaluaron la influencia del sustrato, del pH, del tipo y oferta de taninos en la absorción y fijación del tanino vegetal de acacia. Para este propósito, se ensayaron las siguientes condiciones:

- Sustrato: piel bovina en píquel, polvo de piel bovino, colágeno en polvo;
- Taninos vegetales: extracto de acacia, extracto de acacia modificado;
- Concentración de tanino vegetal: 30%, 45%;
- pH inicial: 3,0, 4,5, 6,0.

El proceso de curtición se realizó en bombos de laboratorio. La duración de los procesos fue de 300 min, el tanino se añadió en una sola toma y éste se fijó al final del proceso mediante la adición de ácido fórmico. Se añadieron 150 ml de agua precalculando las cantidades de tanino, se ajustó el pH inicial y se añadió esta solución a 5g (en peso húmedo) del sustrato. Teniendo en cuenta el contenido en humedad de los sustratos: 53,3% en la piel piquelada, 16,2% en el polvo de piel y 13,7% en el polvo de colágeno, las ofertas de tanino calculadas sobre porcentaje de colágeno en base seca fueron las siguientes: 64,2 y 96,3% para las pieles, 35,8 y 53,7% para el polvo de piel y 34,7 y 52,14% para el colágeno en polvo. Los materiales utilizados fueron polvo de piel bovina producido por Fordchungsinstitut für Leder uns Kunsttoffbahnen Freiber que contiene un 0,5% de Cr_2O_3, extracto de acacia y extracto de acacia modificado (clarificado) producido por TANAC S.A.; hidrolizado de colágeno producido por Protein Trading y piel bovina en píquel.

El contenido en humedad de los sustratos se determinó mediante el análisis de pérdida de peso a 105ºC hasta peso constante, de acuerdo con la norma ISO 4684. Para la determinación del contenido en sólidos totales del medio acuoso antes y después del curtido, se evaporaron muestras de 20 ml y se secaron en

cápsulas de porcelana a 105°C hasta peso constante, según NBR 13572. La determinación de la concentración de taninos en el medio acuoso antes y después de la curtición se realizó con un espectrofotómetro T80 + UV/Vis Spectrometer (PG Instruments Ltd.) usando una longitud de onda de 278 nm obtenida por barrido. El valor de absorbancia se convirtió en concentración (g.L-1) a través de una curva estándar previamente determinada para cada tanino. El potencial zeta del medio acuoso se determinó a través de un equipo Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments Ltd.). Se determinó también el pH de los sustratos y del medio acuoso.

3. Resultados y Discusión

Los sustratos tenían inicialmente un pH de 5,5 para el colágeno, 4,55 en el polvo de piel y 3.10 en la piel piquelada. La piel piquelada se ajustó a pH 5,0 con bicarbonato sódico. En la Figura 1 se muestran las determinaciones de pH del medio acuoso durante el proceso de curtición para el extracto de acacia al 30% de la oferta inicial. A un 45% de la oferta inicial de tanino y extracto de acacia modificado los resultados son muy similares (datos no mostrados).

Se observa que los mayores cambios en el pH tuvieron lugar en los ensayos del medio curtiente acuoso con un pH inicial de 6. Para los sustratos, hubo una mayor variación de pH en medio acuoso con el colágeno, seguido de los ensayos con polvo de piel. La tendencia es que el pH del sustrato y del medio de curtición se equilibren en el proceso, ya que en el caso del colágeno y del polvo de piel hay menos barreras que impiden el intercambio (superficie de piel y red de fibras); lo que hace que el pH de estos medios se aproxime al pH del sustrato con mayor rapidez.

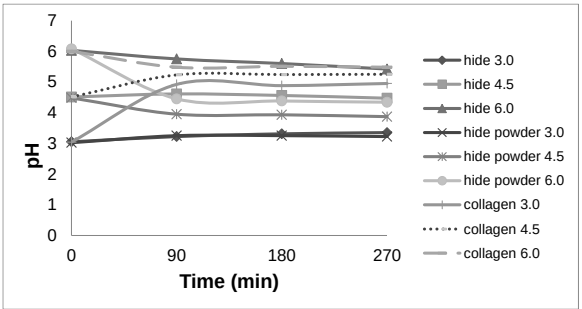

Figura1. *Control del pH durante el proceso de curtición, con extracto de acacia al 30% de la oferta inicial, para los tres substratos y para pH inicial de 3, 4.5 y 6.*

En la Tabla 1se presentan el contenido en sólidos totales, la concentración de taninos y el potencial zeta de los baños de curtición.

Se supone que la acción de curtición ejercida por los taninos se produce a través de los enlaces de hidrógeno de los grupos fenólicos de curtición con ciertos grupos básicos ligados a la cadena polipeptídica. Aunque la fuerza del enlace de hidrógeno individual es baja, el gran número de enlaces de hidrógeno disponibles proporciona una alta estabilización de la estructura del colágeno (Heidemann, 1997).

El proceso de curtición se produce en dos etapas. En primer lugar, las moléculas del tanino se difunden en la piel y en una segunda etapa, las moléculas se fijan finalmente durante la fase de fijación. Según Faber (1990), los factores que influyen en la difusión son: tamaño de partícula, viscosidad de la solución, temperatura, pH, concentración de taninos en la curtición, acción mecánica y otros.

La difusión de los taninos aumenta con el aumento del pH del medio de curtición. Este hecho se asocia a la reducción del tamaño de las partículas de los taninos y modificando el estado de hinchamiento de la piel con respecto al pH, y además; con la disminución de la afinidad y la tendencia de fijación de los taninos al aumentar el pH. El aumento de la velocidad de difusión se produce claramente sólo por encima de pH 4 o 5. En el estado neutro, la velocidad de difusión es especialmente alta. Cuando se completa la difusión se produce la fijación del tanino mediante la reducción del pH. Para ello, se utilizan ácidos orgánicos (Hoinacki y Gutheil, 1978).

Tabla 1. Contenido en sólidos totales, concentración en taninos y potencial zeta de del medio de curtición acuoso .

Ensayo	Sólidos totales (%)		Concentración en taninos ($g.L^{-1}$)	
	inicial	final	inicial	final
1	1.88	1.51	20.43	15.34
2	1.93	1.49	20.59	15.59
3	1.89	1.51	20.85	16.25
4	2.70	2.20	29.98	23.85
5	2.83	2.24	29.40	23.82
6	2.68	2.27	30.63	24.37
7	1.83	0.46	20.43	1.06
8	1.82	0.51	20.43	1.11
9	1.81	0.60	21.11	1.03
10	1.55	0.41	16.24	0.81
11	1.57	0.46	16.07	0.91
12	1.56	0.46	16.59	0.75
13	0.96	2.62	10.20	1.64
14	1.02	2.66	10.31	1.97
15	0.99	2.68	10.07	1.81
16	1.50	2.53	15.45	1.79
17	1.60	2.79	16.98	1.95
18	1.51	2.64	16.15	1.85
19	1.93	1.60	20.65	16.28
20	1.94	1.66	20.45	16.87
21	1.89	1.67	19.93	16.87
22	2.87	2.48	31.86	25.02
23	2.84	2.44	30.92	24.86
24	2.77	2.47	31.40	24.92
25	1.98	0.79	20.72	4.47
26	1.99	0.86	20.98	4.43
27	1.92	0.85	20.55	4.28
28	1.65	0.57	17.39	2.32
29	1.67	0.58	17.39	2.23
30	1.66	0.59	16.80	2.32
31	1.07	2.92	11.32	4.14
32	1.04	2.91	10.70	4.28
33	1.03	2.87	10.31	4.18
34	1.62	2.85	16.61	5.50
35	1.60	2.81	16.77	5.67
36	1.58	2.86	17.22	5.51

Potencial zeta		
Ensayos	inicial	final
10	-7.71	-5.86
11	-13.2	-10.3
12	-13.3	-12.9

Se verifica a través del análisis de los resultados de sólidos totales y concentración de taninos al final del proceso de curtido que el pH inicial del medio acuoso no afecta en la absorción de taninos en los tres sustratos estudiados (Tabla 1). Sin embargo, es posible observar una mayor influencia del sustrato, la concentración de tanino e incluso del tipo de tanino utilizado (Figuras 2, 3 y 4). Los ensayos 10, 11 y 12 mostraron los mejores resultados, con una mayor absorción de taninos evidenciada por concentraciones más bajas de sólidos totales y taninos en el baño residual. En dichas pruebas con polvo de piel el tanino se utilizó sin modificarse en su mayor concentración (53,7%). La velocidad de difusión de los taninos es proporcional a la diferencia de concentración de taninos en el medio acuoso y en la región interfibrilar de la piel. Cuando la diferencia es muy pequeña, la difusión disminuye y finalmente se detiene por completo. Por lo tanto, se facilita la difusión a mayores concentraciones de agentes curtientes. El tanino utilizado en estos ensayos no fue sometido al proceso de sulfitación, donde se obtuvo un tanino clarificado con reducción del contenido en taninos; y el polvo de piel usado se pretrató con cromo (0,5%). Además, en la curtición del polvo de piel se elimina la etapa inicial de difusión a través de las capas de la

piel en bruto, por lo que se utiliza como sustrato estándar eliminando la interferencia del origen o del tipo de piel.
Al comparar los dos métodos utilizados para cuantificar la cantidad de taninos absorbidos, existe una correlación de los resultados obtenidos para la piel. Sin embargo, para el polvo de piel y los sustratos de colágeno no hubo correlación entre los sólidos obtenidos incluso después de la filtración; se cuantificaron los taninos y en el caso del colágeno, resultó en un alto contenido de sólidos totales en las aguas residuales de curtido aún mayor que el medio acuoso al inicio de la curtición.

El método mediante el cual se utiliza la espectrofotometría UV/VIS mostró excelentes resultados, siendo la longitud de onda determinada en el barrido de 278 nm según se describe en la literatura (Kardel et al., 2013) y las concentraciones de taninos determinadas a través de la ecuación generada en la curva de calibración son consistentes con el valor real. Por ejemplo, en el ensayo 31 en el que se añadió 1,7 g/150 ml de tanino se determinó mediante análisis el valor de tanino en 1,698 g/150 ml en el medio acuoso inicial. Según Kardel et al. (2013) los taninos vegetales son polifenoles distribuidos en taninos condensados e hidrolizables con una inmensa variabilidad estructural, alcanzando altos grados de polimerización. Los taninos de diferentes fuentes pueden reaccionar de formas muy diversas según su afinidad con la proteína. Las diferencias en la estructura de los taninos pueden ocurrir incluso entre especies de plantas similares. Esta heterogeneidad genera complicaciones con respecto a una medida estandarizada de taninos.

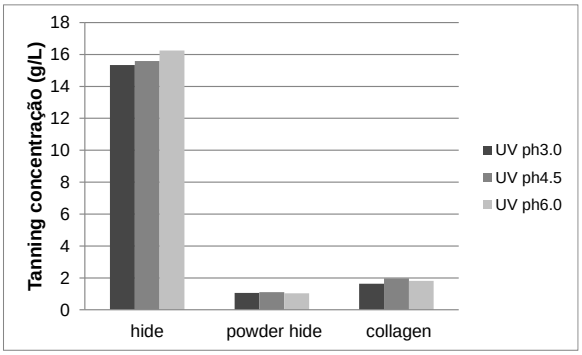

Figura 2. *Concentración de taninos (g /L) en las aguas residuales de curtición, para los tres sustratos y los pH estudiados, con una oferta del 30% de extracto de acacia.*

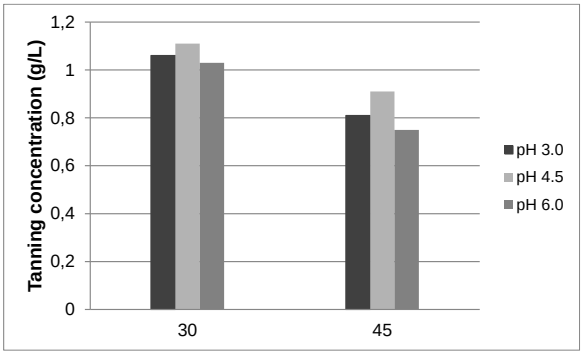

Figura 3. *Concentración de taninos (g /L) en las aguas residuales de curtición, para una oferta del 30% y del 45% de extracto de acacia en el polvo de piel.*

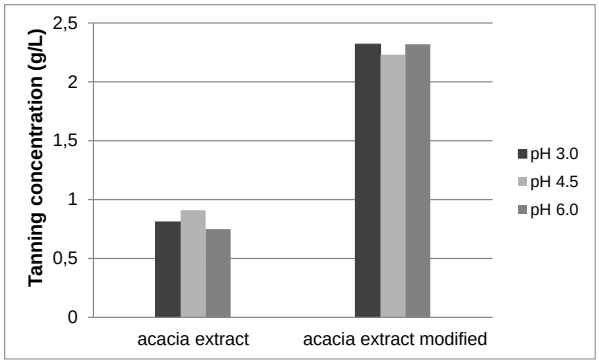

Figura 4. *Concentración de taninos (g /L) en las aguas residuales de curtición, para una oferta del 45% de extracto de acacia y el extracto de acacia modificado con respecto al polvo de piel*

La reactividad del colágeno se atribuye a su punto isoeléctrico el cual depende del estado de ionización de los grupos ácidos y básicos de los aminoácidos. El colágeno tiene un carácter de electrolito anfótero multifuncional que actúa como un ion dipolar.
El análisis del Potencial Zeta es una técnica aplicada a la determinación de la carga superficial de nanopartículas en suspensión (coloides). Las nanopartículas tienen una carga superficial que atrae una capa fina de iones de carga opuesta hacia la superficie de la nanopartícula (Mantilla *et al*., 2007).

En los ensayos donde se obtuvieron los mejores resultados en absorción de taninos se determinó también el potencial zeta (Tabla 1). Se verifica que ambos taninos, con o sin modificación tienen carácter aniónico, hecho acorde con lo indicado por Özacar and Sengil (2003) y después del proceso de curtición se aproxima al punto isoeléctrico (-13.2 a -10.3).

4. Conclusiones

En las condiciones estudiadas, la variación del pH del medio de curtición acuoso no influyó en la absorción de taninos durante la curtición. Sin embargo, el sustrato, la concentración de taninos e incluso el tipo de tanino utilizado mostraron gran influencia. Los mejores resultados de absorción de taninos se obtuvieron en los ensayos en los que se utilizó el polvo de piel como sustrato y el tanino sin modificar en su máxima concentración. El método de determinación de taninos por espectrofotometría UV/VIS puede considerarse un método factible para realizar análisis cuantitativos de taninos en medio de curtición acuoso, mostrando excelentes resultados. El procedimiento es de fácil aplicación y no requiere del uso de reactivos que en última instancia, aumentan los costes.

5. Agradecimientos

Los autores quieren agradecer a Capes (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Edital 15/2014 - CAPES/EMBRAPA) por la beca y a FINEP (Edital MCTI/FINEP CT-HIDRO 01/2013) por el soporte financiero recibido para esta investigación.

6. Referencias

Adamczyk, B., Adamczyk, S., Smolander, A., Kitunen, V. Tannic acid and Norway spruce condensed tannins can precipitate various organic nitrogen compounds. *Soil Biology and Biochemistry*, **43**, 628–637, 2011.

ASSOCIAÇÃO Brasileira de Normas Técnicas. NBR 11057: Couro - Determinação do pH e da cifra diferencial. Rio de Janeiro, 1999b, p.1-3.

ASSOCIAÇÃO Brasileira de Normas Técnicas.NBR 13572: Água residuária e banho residual resultantes de curtume — Determinação de sólidos totais e sólidos suspensos totais. Rio de Janeiro, 2012b, p.1-4.

Bhat, T.K., Singh, B., Sharma, O.P. Microbial degradation of tannins – A current perspective. *Biodegradation*, **9**, 343–357, 1998.

D'Aquino, A., Barbani, N., D'Elia, G., Lupinacci, D., Navigella, B., Seggiani, M., Tomaselli, M., Vitolo, S. Combined Organic Tanning Based on Mimosa and Oxazolidine: Development of Semi-Industrial Scale Process for High-Quality Bovine Upper Leather. *Journal Society Leather Technology Chemistry*, **88**, 47-55, 2004.

Falcão, L., Araújo, M.E.M. Tannins characterization in historic leathers by complementary analytical techniques ATR-FTIR. UV-Vis and chemical tests. *Journal of Cultural Heritage*, **14**, 499–508, 2013.

Faber, K. Bibliotek des Leders Band 3: Gerbmittel. Frankfurt: Gerbund und Nachgerbund. 2nd Ed. v.29, n.30, p.95, 1990.

Fontoura, J.T., Gutterres, M. Damage of pickled hides. wet-blue leather and vegetable tanned leather due to biodeteriation. *Journal of the American Leather Chemists' Association*, **110**, 138-144, 2015.

Gutterres, M. *Absorção de Agentes de Curtimento e Engraxe e Modificação da Matriz de Colágeno.* XXVII Congresso da International Union of Leather Technologists and Chemists Societies. Cancun. México. 2003 e Boletín Técnico de la Associación Química Española de la Industria del Cuero, v.54, n.4, p.207-215, 2003.

Haslam, E. Plant polyphenols – vegetable tannins revisited. Cambridge University Press. Cambridge, 1989, 453p.

Heidemann, E. Comparison between chrome and vegetable tanning. inferred from collagen bond position. *Das Leder*, **28**, p.99-104, 1997.

Hoinacki, E., Gutheil, N.C. Peles e couros: origens. defeitos e industrialização. Porto Alegre: CIENTEC: Novo Hamburgo: CTCCA, 1978, 264p.

Kardel, M., Taube1, 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.

Kolomaznik, K., Adamek, M., Andel, I., Uhlirova, M. Leather waste-potential threat to human health. and a new technology of its treatment. *Journal of Hazardous Materials*, **160**, 514–520, 2008.

Krishnamoorthy, G., Sadulla, S., Sehgal, P.K., Mandal, A.B. Green chemistry approaches to leather tanning process for making chrome-free leather by unnatural amino acids. *Journal of Hazardous Materials*, **215**, 173– 182, 2012.

LEMMENS, R.H.M.J. WULIJARNI-SOETJIPTO, N. *Plant Resources of South-East Asia No. 3: Dye and Tannin-Producing Plants*, Pudoc : Wageningen, 1991.

Mantilla, C., Pedraza, J., Laverd. D. Utilización de estudios de potencial zeta en el Desarrollo de un proceso alternativo de Flotación de mineral feldespático. *Dyna*, **154**, 65-71, 2008.

Marsal, A., Maldonado, F., Cuadros, S., Bautista, M.E., Manich, A.M. Adsorption isotherm. thermodynamic and kinetics studies of polyphenols onto tannery shavings. *Chemical Engineering Journal*, **183**, 21– 29, 2012.

Monteiro, J.M., Albuquerque, U.P., Araújo, E.L. Taninos: Uma abordagem da Química à Ecologia. *Quimica Nova*, **28**, 892-896, 2005.

Onem, E., Gulumser, G., Akayb, S., Yesil-Celiktas, O. Optimization of tannin isolation from acorn and application in leather processing. *Industrial Crops and Products*, **53**, 16– 22, 2014.

Özacar, M., Sengil, I.A. Evaluation of tannin biopolymer as a coagulant aid for coagulation of colloidal particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **229**, 85–96, 2003.

Pizzi, A. Tannins: Major Sources. Properties and Applications. *In: Monomers. Polymers and Composites from Renewable Resources*, p.179- 199, 2008.

Spencer, C.M., Cai, Y., Martin, R., Gaffney, S.H., Goulding, P.N., Magnolato. D., Lilley, T.H., Khanbabaee, K., Ree, T. Tannins: classification and definition. *Natural Product Report*, **18**, 641–649, 2001.