

# BIODEGRADACIÓN DE RESINAS DE FENOL-FORMALDEHÍDO MODIFICADAS CON LIGNINAS POR ATAQUE DE HONGOS FILAMENTOSOS

Yesica Giordano <sup>(1)</sup>, Ariela Pujol <sup>(1)</sup>, Mariana Bernard <sup>(1)</sup>, Verónica V. Nicolau <sup>(1,2)</sup>

<sup>(1)</sup> GPol, UTN Regional San Francisco, Av. de la Universidad 501, (2400) San Francisco, Córdoba, Argentina.

<sup>(2)</sup> INTEC (UNL-CONICET), Güemes 3450, (3000) Santa Fe, Argentina.

E-mail: yesicamariagiordano@gmail.com

## Resumen

Debido al impacto ambiental causado por el uso creciente de polímeros derivados del petróleo, existe un gran interés en el desarrollo de nuevos polímeros basados en fuentes renovables. Se busca diseñar materiales que exhiban buena resistencia mecánica durante su uso y que presenten biodegradabilidad al final de su vida útil.

En este trabajo se estudió experimentalmente la biodegradación de diferentes materiales termoestables basados en resoles modificados con 10% p/p de lignosulfonato de sodio (LPF10) y 10% y 20% p/p de lignina del tipo Kraft, (KPF10 y KPF20, respectivamente) empleando como testigo una resina de fenol-formaldehído (PF). El trabajo involucró la síntesis de los materiales, el aislamiento de una cepa silvestre de *Alternaria* sp., la degradación de los polímeros por hidrólisis química y enzimática de hongos filamentosos (*Aspergillus niger* y *Alternaria* sp.) por un período de 200 días, y la caracterización de los materiales antes y después de la degradación, por gravimetría y espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR). Además se monitoreó el crecimiento del micelio (húmedo y seco). La biodegradación incrementó en el siguiente orden PF < LPF10 < KPF10 < KPF20 con ruptura de uniones del tipo éter. Los resoles fueron sintetizados en la empresa Centro S.A, San Francisco, Córdoba.

## Introducción

Las resinas de PF son los polímeros sintéticos más antiguos que se conocen y se comercializan desde hace más de 100 años. Actualmente estas resinas se emplean en la obtención de laminados decorativos, aglutinantes de madera, adhesivos, recubrimientos, plásticos moldeados, y componentes aeroespaciales, debido a las excelentes propiedades físicas y mecánicas que poseen (Gardziella et al., 1999).

Las resinas base de PF del tipo resol son una mezcla líquida de monómeros, dímeros y trímeros metilolados obtenidos por reacción entre el fenol (P) y el formaldehído (F) en medio alcalino y su síntesis consiste en una hidroximetilación-condensación. Durante la hidroximetilación las posiciones *orto*- y *para*- del anión fenolato reaccionan con el F y se generan los hidroximetilfenoles. Estos últimos reaccionan con formación de uniones metileno ( $\text{—CH}_2\text{—}$ ) y éter ( $\text{—CH}_2\text{OCH}_2\text{—}$ ) [Fig. 1 a)].

En las últimas décadas ha surgido interés en reemplazar al P (tóxico, costoso, derivado del petróleo y de importación) por otras materias primas que sean más económicas y de menor impacto ambiental. Una de las alternativas consiste en sustituir parcialmente el P por ligninas, debido a la similitud estructural que existe entre las ligninas y las resinas base de PF (Fors et al., 1979). Las ligninas y sus derivados son polímeros naturales polifenólicos que provienen principalmente de la industria celulósica y su color varía desde el pardo al marrón oscuro. Su estructura es compleja y depende de la especie de planta de la cual es obtenida, del proceso de pulpado usado para separarla de la celulosa, y de los tipos de recuperación que se le realizan al licor negro. Las ligninas comerciales poseen azufre en su composición y se clasifican en dos tipos: de tipo Kraft y los lignosulfonatos (Chávez-Sifontes et al., 2013). Las principales uniones son del tipo  $\text{—C—C—}$  y  $\text{—COC—}$  [Fig. 1 b)]. La unión  $\beta\text{-O-4}$  representa aproximadamente un 45% y un 60-65% de los enlaces presentes en maderas blandas y duras, respectivamente (Alonso, 2002).

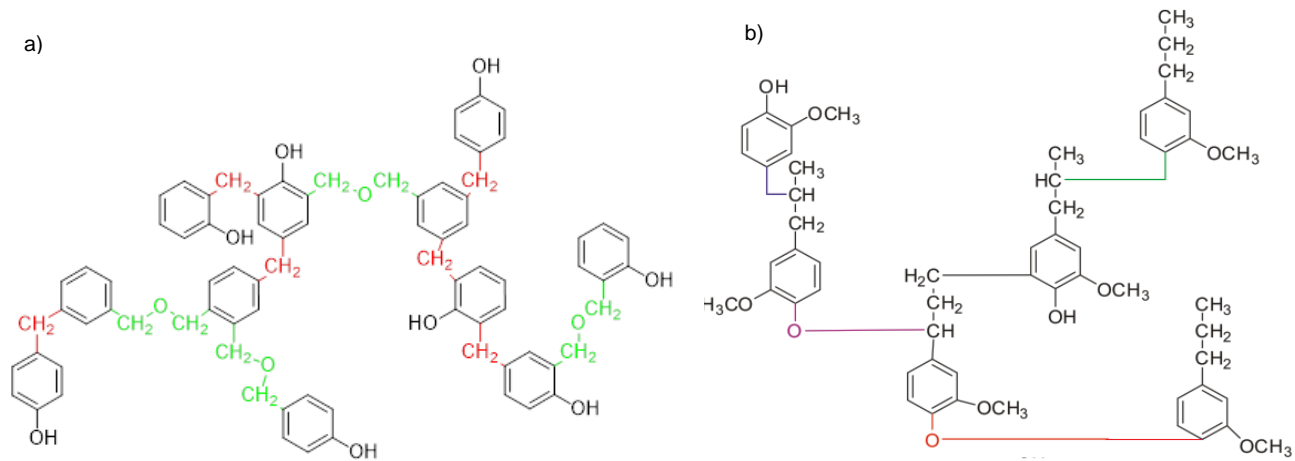


Fig. 1. Estructuras moleculares características: a) resol, b) lignina.

La descomposición de los desechos de resinas de PF únicamente es posible realizando la incineración del material, ya que son muy resistentes a la temperatura, pH extremos, alta humedad, radiación y corrosión. Desafortunadamente el proceso de incineración contamina, por lo que una alternativa es la biodegradación que consiste en la degradación microbológica de compuestos complejos a sustancias elementales y de contaminantes a compuestos no tóxicos. Sin embargo hasta hace poco más de 9 años no se tenía evidencia de la biodegradabilidad de estas resinas (Gusse et al., 2006). Debido a la importancia de estos materiales en el mercado y la acumulación de sus desechos es imperativo encontrar sistemas biológicos capaces de reciclar al ambiente estos compuestos contaminantes.

Los hongos ligninolíticos, también llamados hongos de la pudrición blanca de la madera, tienen la capacidad de degradar la lignina (Ponce Andrade et al., 2012). Dentro de estos hongos se encuentran los géneros *Alternaria*, *Ulocladium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Helicomyces*, *Mucor* y *Aspergillus* (Laura et al., 2009).

En este trabajo se estudió la degradación, por hidrólisis química y enzimática (de cultivos de *Aspergillus niger* y una cepa silvestre aislada e identificada como *Alternaria* sp.) de resinas de lignina-fenol-formaldehído del tipo resol, sintetizados en la empresa Centro S.A, San Francisco, Córdoba. Los resultados de degradación de los resoles derivados de ligninas se compararon con los correspondientes a una resina fenólica comercial.

## Materiales y Métodos

### Materiales

Los materiales empleados para la síntesis de las resinas fueron: solución de formol al 37% p/p (Alto Paraná, Argentina), fenol (Dalgar S.A, distribuidor en Argentina), lignosulfonato de sodio en polvo con 23,45% p/p de cenizas y 13,63% p/p de azúcares (Vixilex SDX, Brasil), y lignina del tipo Kraft con 21,67% p/p de cenizas y 5,16% p/p de azúcares (Suzano, Brasil).

### Síntesis de los Resoles y Obtención de los Materiales Poliméricos

Se sintetizaron 4 resinas de PF del tipo resol en un reactor batch tanque agitado de 3000 l perteneciente a Centro S.A. El resol tradicional PF se obtuvo por reacción entre una solución de P 91% p/p y una solución de F 37% p/p a pH=9. Los resoles modificados se obtuvieron por reemplazo de un 10% p/p de P por lignosulfonato de sodio y lignina de tipo Kraft (LPF10 y KPF10, respectivamente) y un 20% p/p de lignina de tipo Kraft (KPF20) previa reactivación de las ligninas por hidroximetilación con F.

Los materiales poliméricos se obtuvieron por curado de las resinas en estufa a 100 °C durante 24 horas.

## Microorganismos

Para los estudios de biodegradación se emplearon una cepa de *Aspergillus niger*, ATCC 16404 provista por el CEPROCOR (Ministerio de Industria, Comercio, Minería y Desarrollo Científico de la Provincia de Córdoba, Argentina); y una cepa silvestre que desarrolló espontáneamente sobre la superficie de un resto de resina curada modificada con lignina que quedó como remanente en el laboratorio de Centro S.A.

Para el aislamiento del hongo se sembró con ansa aguja en agar extracto de malta (MEA) y se llevó a estufa a 30 °C por 48 h. Las características macroscópicas y microscópicas del hongo se emplearon para su identificación.

La composición del MEA fue la siguiente: 0,1% m/v de peptona de carne (Britania), 2% m/v de extracto de malta (Britania), 2% m/v de glucosa (Cicarelli) y 2% m/v de agar (Britania).

Las cepas fueron conservadas en MEA pico de flauta, cubriendo el micelio con glicerol. Los cultivos se obtuvieron por reactivación de las cepas conservadas mediante 3 siembras sucesivas en MEA. Entre cada siembra, los cultivos se incubaron a 30 °C durante 96 h.

## Ensayos de Degradación

Los estudios de degradación se efectuaron en dos etapas. Primero se realizaron ensayos preliminares en cajas de Petri. Luego se llevaron a cabo estudios de degradación en medio líquido basal con y sin microorganismos, y en agua sin microorganismos.

La composición del medio basal empleado para los ensayos fue la siguiente:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2000 mg/l),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (7000 mg/l),  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (1000 mg/l), Glucosa (3000 mg/l),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (100 mg/l),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1 mg/l),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.1 mg/l),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (10 mg/l),  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (2 mg/l) (Spontón et al., 2013). Nótese que se emplearon las sales penta- y mono- hidratadas de  $\text{CuSO}_4$  y  $\text{MnSO}_4$  en lugar de las correspondientes hepta-hidratadas.

Para la preparación del inóculo se sembró una ansada del cultivo en 10 ml de caldo extracto de malta a 30 °C durante 96 h. El contenido del tubo se vertió en un Erlenmeyer conteniendo 100 ml de caldo extracto de malta y se incubó a 30 °C durante 96 h.

### a) Ensayos Preliminares

Se realizaron ensayos preliminares en cajas de Petri a fin de comprobar la habilidad de degradación de las cepas mediante la observación de halos transparentes alrededor de los puntos de siembra. En estos ensayos, las muestras pulverizadas se mezclaron con el medio de cultivo, se autoclavaron y se vertieron bajo agitación en cajas de Petri. Se realizaron dos ensayos empleando distintos medios de cultivo. En el primero se empleó agar-agar como única fuente de C y N. En el segundo se empleó el medio basal agarizado conteniendo glucosa y nitrato de amonio como fuentes de C y N.

Las cajas de Petri se inocularon con los cultivos de *Aspergillus niger* y la cepa silvestre mediante siembra por punción y se incubaron a 30 °C durante 10 días.

### b) Ensayos en Medio Líquido

Para los ensayos en medio líquido se cortaron muestras de resina de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> y se secaron en estufa de vacío a 60 °C hasta peso constante.

### b.1) Hidrólisis Enzimática

Para cada hongo se esterilizaron 16 frascos conteniendo 20 ml de medio basal y 4 muestras de cada material (PF, LPF10, KPF10 y KPF20) en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Luego se colocó una muestra de cada material estéril por frasco y se sembró con 1 ml de inóculo. Además se hicieron los correspondientes blancos empleando medio basal con microorganismos (sin adición de polímero). La incubación se realizó en estufa a 30 °C. Se midió el crecimiento de micelio (húmedo y seco) por gravimetría.

### b.2) Hidrólisis Química

A fin de seguir la degradación por hidrólisis química, para cada resina (PF, LPF10, KPF10 y KPF20) se colocaron 4 muestras en 4 Erlenmeyer con 40 ml de agua destilada y se llevaron a estufa a 30 °C.

### b.3) Caracterización de los Materiales Antes y Después de la Degradación

Se midió la pérdida de peso de los materiales por degradación química a los 30, 60, 120 y 180 días y los correspondientes a degradación enzimática a los 30, 60, 141 y 200 días. Además se hicieron mediciones por FTIR a fin de evidenciar cambios estructurales producto de la degradación.

Los espectros FTIR fueron obtenidos en un espectrofotómetro Shimadzu FTIR-8201 PC de transformada de Fourier en la región de frecuencia de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Se prepararon pastillas de bromuro de potasio (KBr) conteniendo 2-3% de muestra seca. Para el análisis de los espectros se empleó el software del equipo Hyper IR. La identificación de bandas características se hizo de acuerdo a Poljansek et al., 2005.

## Resultados y Discusión

La cepa silvestre aislada se identificó como *Alternaria* sp. Macroscópicamente se observaron colonias algodonosas de inicio blanco, grisáceas, que con el tiempo oscurecían. Microscópicamente se observó la presencia de hifas septadas dematiáceas y conidios con septos transversales y longitudinales redondos en un extremo y estrechos en el otro.

En relación a los ensayos preliminares, se observó la formación de zonas claras (halos transparentes) alrededor de las colonias sólo en las cajas que contenían el medio basal indicando posible degradación de los polímeros. En la [Fig. 2 a)] se observa la formación de un halo transparente alrededor de la colonia de *Aspergillus niger* para KPF20.

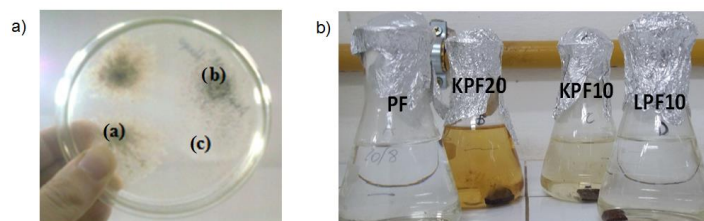


Fig. 2. a) Ensayos preliminares en cajas de Petri para KPF20 [(a) *Alternaria* sp., (b) *Aspergillus niger* y (c) halo de inhibición]; b) Hidrólisis química: 180 días.

En la Fig. 3 se muestran las curvas de crecimiento de micelio húmedo para *Aspergillus niger* y *Alternaria* sp. El *Aspergillus niger* mostró un crecimiento importante y similar para LPF10, KPF10, KPF20 durante los primeros 30 días de incubación [Fig. 3 a)]. El crecimiento para PF y el blanco resultó menor y más lento en comparación con las muestras modificadas con ligninas. A partir de los 50 días comenzó la etapa de muerte seguida de lisis celular. En la [Fig. 3 b)] se observa que la

velocidad de crecimiento de la *Alternaria* sp. para LPF10 y KPF20 resultó menor en comparación con la velocidad de crecimiento del *Aspergillus niger* y mayor para PF.

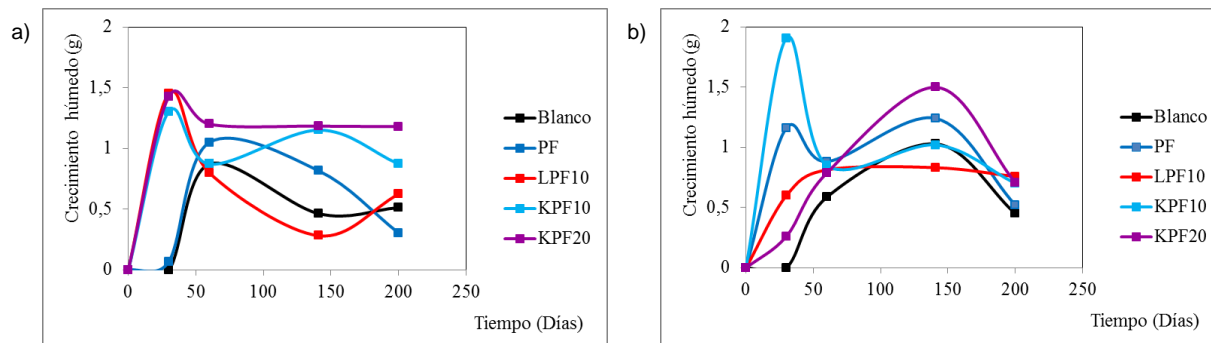


Fig. 3. Crecimiento de micelio húmedo: a) *Aspergillus niger*, b) *Alternaria* sp.

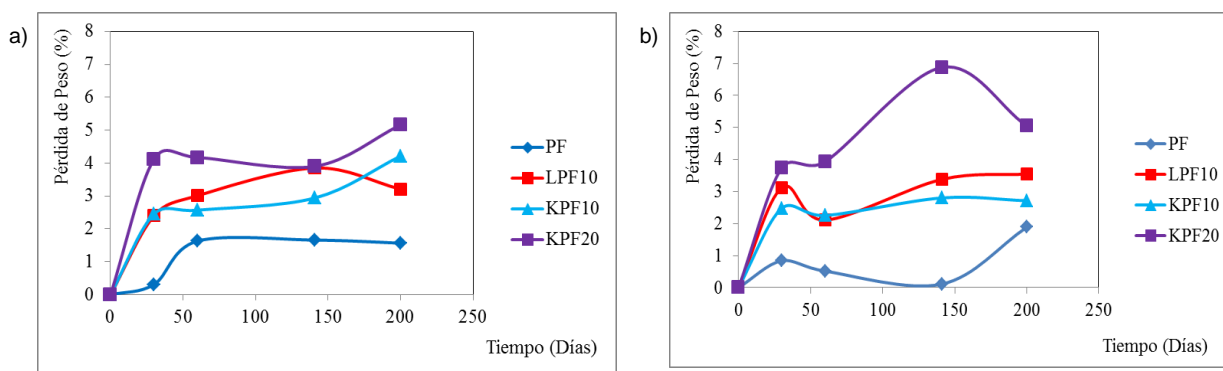


Fig. 4. Pérdida de peso por hidrólisis enzimática: a) *Aspergillus niger*, b) *Alternaria* sp.

El máximo crecimiento para KPF20 se evidenció a los 150 días. El crecimiento de micelio seco mostró un comportamiento similar al crecimiento húmedo.

En la Fig. 4 se muestra la pérdida de peso de los materiales atacados por el *Aspergillus niger* y la *Alternaria* sp. Como era de esperar la pérdida de peso, producto de la degradación, resultó mayor para los materiales modificados con ligninas e incrementó en el siguiente orden: PF < LPF10 < KPF10 < KPF20.

Sólo KPF20 sufrió degradación por hidrólisis química (Tabla 1). Estos resultados coinciden con la intensa coloración del agua del Erlenmeyer para KPF20 al final de la hidrólisis química indicando difusión de los compuestos de degradación de los polímeros [Fig. 2 b)].

Tabla 1. Hidrólisis química

	0 días	30 días	60 días	120 días	180 días
PF	0	0	0	0	0
LPF10	0	0	0	0	0
KPF10	0	0	0	0	0
KPF20	0	0	0	4,21%	3,34%

En la Fig. 5 se muestran los espectros obtenidos por FTIR para las muestras KPF10 a 0, 60 y 180 días de hidrólisis química y enzimática. El seguimiento de la degradación se hizo a partir de la relación de uniones éter/uniones metileno (relación de áreas bajo los picos a 1219 y 1481  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente). La relación de áreas se mantuvo constante en el tiempo para las muestras

sometidas a hidrólisis química [Fig. 5 a)] mientras que disminuyó en las muestras correspondientes a hidrólisis enzimática [Fig. 5 b) y c)]. Estos resultados sugieren incipiente biodegradación de los materiales evidenciada por la ruptura de uniones del tipo éter. Resultados similares se observaron para LPF10, KPF20 y PF.

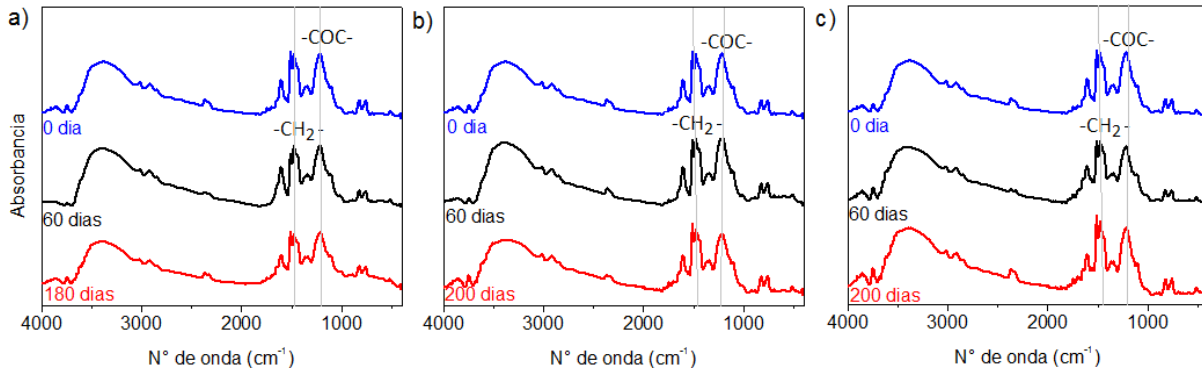


Fig. 5. FTIR para KPF10: a) Hidrólisis química, b) *Aspergillus niger* c) *Alternaria* sp.

## Conclusiones

El empleo de ligninas en reemplazo parcial de fenol en la síntesis de resinas de PF del tipo resol, permitió generar nuevas arquitecturas macromoleculares más amigables con el medio ambiente. El *Aspergillus niger* y la cepa silvestre de *Alternaria* sp. resultaron capaces de degradar los materiales termoestables basados en resoles modificados con ligninas del tipo Kraft y lignosulfonato de sodio en un período de 200 días. El seguimiento del peso del micelio mostró un importante crecimiento durante el proceso. La pérdida de peso de las muestras corroboró la degradación de los materiales que incrementó en el siguiente orden: PF < KPF10 ≤ LPF10 < KPF20. El análisis espectroscópico (FTIR) resultó una herramienta poderosa para dilucidar el mecanismo de degradación de los materiales que involucró hidrólisis de las uniones del tipo éter.

En futuros trabajos se caracterizarán los polímeros antes y después de la biodegradación por microscopía de barrido electrónica (SEM).

## Agradecimientos

A UTN, CONICET, y SeCyT por el financiamiento.

## Referencias

- Alonso, M. V., "Formulación y Curado de Resinas de Fenol Formaldehído del Tipo Resol con Reemplazo Parcial de Fenol por Lignosulfonato de Amonio", Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, España, (2002).
- Chávez-Sifontes, M.; Domine M. E., *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 4(4), 15-46 (2013).
- Forss, K.G.; Fuhrmann, A., *Paperija Puu*, 58(11), 817-824 (1979).
- Gardziella, L.A.; Pilato, A.; Knop, A., "Phenolic Resins". Ed. Springer, (1999).
- Gusse, A.C.; Millar, P.D.; Volk T., *J. Environ. Sci. Technol.*, 40, 4196-4199 (2006).
- Laura, J.; Castellanos, P., *Rev. peru. biol.*, 16(1), 125-128 (2009).
- Poljansek, I.; Krajnc, M.; Sebenik, U., *J. Appl. Polym. Sci.*, 99, 2016-2028 (2005).
- Ponce Andrade, G.; Vázquez Duhalt, R.; Rodríguez Vázquez, R.; Medina Ramírez, J.; Jáuregui Rincón, *J. Rev. Int. Contam. Ambie.*, 28(2), 159-166 (2012).

Spontón, M.; Casis, N.; Raud, B.; Mazo, P.; Rios, L.; Simonetta, A.; Estenoz, D., *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 85-94 (2013).