

ESTUDIO DE LIGNINAS BIODEGRADADAS APLICANDO EL METODO DE LAS CURVAS DIFERENCIALES $\Delta\epsilon$

G.M. Ortega Arias-Carbajal, M. del C. Espinosa, R. Contreras, G. Roura y C. Baluja

Departamento de Microbiología Industrial, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de la Habana, Cuba

Recibido: 5 de mayo de 1988

ABSTRACT. A UV spectroscopic study was carried out by means of the $\Delta\epsilon$ differential method with biodegraded lignin samples isolated from fermented cane bagasse with different white fungus strains. A determination of the free phenolic hydroxyls present in each lignin was also performed. It can be stated that the fundamental structures of the biodegraded lignins are in correspondence with phenolic compounds with hydroxyl groups conjugated with the aromatic ring by means of a carbonyl group or double links. It was found that the M7 strain lignin has the lowest percentage of free phenolic hydroxyls, being this strain the one that shows greater degradation of the lignin from the sugar bagasse.

RESUMEN. En el presente trabajo se realiza un estudio espectroscópico UV, aplicando el método diferencial $\Delta\epsilon$, en muestras de ligninas biodegradadas, aisladas de bagazo de caña fermentado, con diferentes cepas de hongos blancos, así como también se realiza una determinación de la cantidad de hidroxilos fenólicos libres presentes en cada lignina. Se comprobó que las estructuras fundamentales de las ligninas biodegradadas, corresponden a compuestos fenólicos que presentan grupos hidroxilos conjugados con el anillo aromático, por medio de un grupo carbonilo o dobles enlaces, así como también que la lignina correspondiente a la cepa M7 es la que presenta menor cantidad de hidroxilos fenólicos libres, siendo esta cepa la que mayor degradación de lignina presenta en bagazo de caña.

INTRODUCCION

La lignina es un material amorfo que tiene como base una estructura aromática y que forma parte de la madera y de otros materiales celulósicos. Se caracteriza por un contenido considerable de grupos metoxilos y por la presencia de grupos hidroxilos, una parte de los cuales son de naturaleza fenólica.¹ Su estructura química aún no ha sido completamente elucidada. Es un polímero formado por la condensación de unidades estructurales de varios tipos, fundamentalmente del tipo fenil-propano (C_6C_3), pero éstas pueden estar combinadas de varias formas, dependiendo del material celulósico que se trate.

Un método para el estudio de las ligninas es la aplicación de las curvas diferenciales $\Delta\epsilon^2$, mediante el cual, el cambio de la absorción producida por un fenol (o cualquier otro electrolito) ionizado, por ejemplo el cambio de ácido-neutro hasta una solución fuertemente alcalina puede ser demostrado graficando el cambio del coeficiente de extinción molar ($\Delta\epsilon$) contra la longitud de onda. Las curvas $\Delta\epsilon$ son características de un fenol en cualquier solvente.

Según la ley de Lambert Beer, si la concentración (c) de un fenol es igual en ambas soluciones ácido-neutra y alcalina, la diferencia en la densidad óptica (ΔD) para cada longitud de onda es proporcional a c ($\Delta D = c \cdot \Delta\epsilon$).

Si se conoce que la absorción de un material no ionizable es igual en medio alcalino y (ρ) en medio ácido-neutro, esto se puede eliminar mediante la sustracción de los coeficientes de extinción molar de ambos medios a cada longitud de onda, o sea, realizando el llamado método $\Delta\epsilon$.³ Esto también se cumple cuando el material no ionizable se combina químicamente con el fenol, de tal manera que las propiedades del cromóforo no se alteren.

Las curvas $\Delta\epsilon$ son características solamente de materiales fenólicos ionizables y pueden ser usadas para obtener información cualitativa y cuantitativa de estos materiales por comparación con curvas $\Delta\epsilon$ de fenoles modelos.

En el presente trabajo se realizó un estudio espectroscópico UV aplicando el método diferencial $\Delta\epsilon$, de muestras de ligninas

biodegradadas, con diferentes cepas de hongos blancos aislados de bagazo de caña con el objetivo de lograr su caracterización y determinar la cantidad de grupos hidroxilos fenólicos libres presentes en cada una de ellas.

MATERIALES Y METODOS

Las determinaciones espectroscópicas se realizaron empleando espectrofotómetro UV visible, M-40.

Se prepararon cultivos de las cepas F₈₋₁, F₈₋₃, M7 en 100 g de bagazo de caña, usando como medio DL⁴ sin fuente de nitrógeno y glucosa al 0,25 % como fuente de carbono los cuales fueron incubados durante 18 d a 37 °C. También se empleó bagazo de caña no fermentado como blanco.

Las muestras fueron procesadas en un molino de bolas con tolueno y luego, se extrajeron empleando dioxano-agua (9:1), para aislar las ligninas biodegradadas correspondientes a cada cepa, así como la lignina del blanco, como se reporta en la literatura.⁵

Se pesaron muestras de alrededor de 1 mg de cada lignina biodegradada aislada, así como de la lignina correspondiente al bagazo de caña sin fermentar y se disolvieron en mezclas de dioxano-NaOH (0,1 mol/L) (1:1), así como en dioxano-HCl (0,1 mol/L) (1:1) respectivamente y luego, se obtuvieron los espectros UV, mediante los cuales se determinaron los coeficientes de extinción molar ϵ a cada λ para cada muestra en ambas soluciones.

Así se procedió a la construcción de las curvas diferenciales $\Delta\epsilon$ como se reporta en la literatura,³ sustrayendo los coeficientes de extinción molar correspondientes a cada muestra en cada medio.

[ϵ dioxano-NaOH (0,1 mol/L) (1:1)- ϵ (dioxano-HCl (0,1 mol/L) (1:1)), a cada longitud de onda, obteniendo así la variación $\Delta\epsilon$]. Luego se graficaron las curvas $\Delta\epsilon$ vs λ para cada muestra de lignina.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 1 y en la Tabla I se muestran las curvas diferenciales correspondientes a cada lignina biodegradada por las diferentes cepas utilizadas, así los valores respectivos.

TABLA I

Valores de las curvas diferenciales correspondientes a la degradación de ligninas mediante diferentes cepas de hongos blancos

Lignina	λ máxima (nm)	$\Delta\epsilon$ máximo ($\cdot 10^3$) ($1 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	λ mínima (nm)	$\Delta\epsilon$ mínimo ($\cdot 10^3$) ($1 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	λ máxima (nm)	$\Delta\epsilon$ máximo ($\cdot 10^3$) ($1 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
Bagazo de caña no fermentado (blanco)	250	1,15	310	3,45	370	4,4
F8-1	250	2,05	316	0,8	370	3,7
F8-3	250	2,8	320	2,1	365	5,65
M7	no tiene máximo aunque presenta absorción		320	0,85	370	3,0

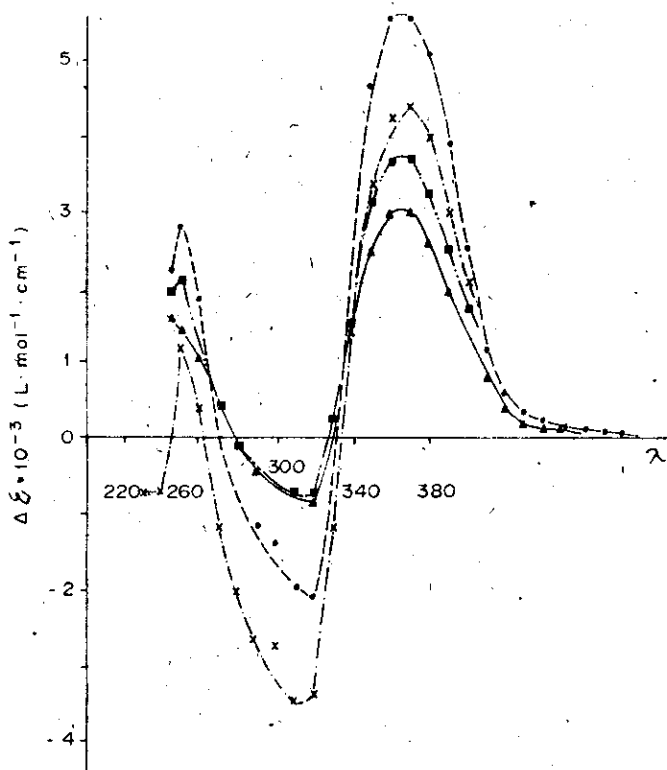


Fig. 1. Curvas diferenciales $\Delta\epsilon$ vs λ correspondientes a ligninas biodegradadas por diferentes cepas de hongos blancos, aisladas de bagazo de caña
Lignina del blanco (bagazo no fermentado); con M7; con F8-1; con F8-3

En la literatura⁴ se reporta un corrimiento batocrómico característico de la absorción máxima a 280 nm para la lignina en medio alcalino, el cual se debe a la ionización de grupos fenólicos. Los máximos establecidos aproximadamente a 250 y 300 nm en las curvas diferenciales $\Delta\epsilon$, obtenidas por sustracción del espectro de la lignina en solución neutra del correspondiente espectro en solución alcalina son características de la absorción del ión fenolato (de compuestos con hidroxilos aromáticos, sustituidos). Las soluciones alcalinas de los compuestos fenólicos cuyos grupos hidroxilos están conjugados, a través de un enlace con un grupo carbonilo, tienen un máximo cerca de 250 y 350 hasta 400 nm. Mientras que el máximo a 250 nm es común a ambos tipos de compuestos, el máximo de 300 nm de las curvas diferenciales es característico para los grupos hidroxilos sin tal conjugación.

De acuerdo a los compuestos modelos reportados en la literatura,^{5,6} las estructuras fundamentales de las muestras de ligninas biodegradadas correspondientes a las cepas F8-1, F8-3, M7, corresponden al tipo de compuestos fenólicos con grupos hidroxilos conjugados por medio de un grupo carbonilo o dobles enlaces con

el anillo aromático, ya que en este caso apareció en todas las muestras un máximo alrededor de 370 nm y de gran intensidad ($3,0$ a $6,0$) $\cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, lo cual también se cumple para el blanco

Para las ligninas correspondientes a las cepas F8-1 y M7, se observa una disminución en la intensidad del máximo correspondiente a 370 nm, con respecto al bagazo no fermentado (blanco) y en la lignina de la cepa F8-3 se observa un aumento en la intensidad del mismo máximo con respecto al blanco. Esto último pudiera explicarse por la formación de nuevas sustancias (producto de la degradación de la muestra por el microorganismo), con la misma estructura y con menor peso molecular, lo que conlleva a que el coeficiente de extinción molar sea más intenso.

Partiendo de los $\Delta\epsilon$ máximos se calcularon las variaciones de las absorptividades molares y considerando el blanco se determinó la cantidad de hidroxiloxi fenólicos en las muestras. Estos resultados se muestran en la Tabla II.

TABLA II

Cantidad de hidroxilos fenólicos libres en muestras de ligninas biodegradadas mediante diferentes cepas de hongos blancos

Lignina biodegradada	[OH] (%)
F8-1	7,18
F8-3	10,97
M7	5,82

Se puede observar que la lignina biodegradada correspondiente a la cepa M7 presenta la menor cantidad de hidroxilos fenólicos libres siendo esta cepa la que experimenta la mayor degradación de lignina en bagazo de caña. Estos resultados se corresponden con los reportados en la literatura.⁷

CONCLUSIONES

Se determinó que las estructuras fundamentales de las ligninas aisladas de bagazo de caña de azúcar (tanto las biodegradadas mediante las cepas de hongos blancos, F8-1, F8-3 y M7, así como la del bagazo de caña no fermentado), corresponden al tipo de compuestos fenólicos que presentan grupos hidroxilos conjugados con el anillo aromático, por medio de un grupo carbonilo o de dobles enlaces.

Se comprobó que la lignina biodegradada empleando la cepa M7 es la que presenta menor cantidad de hidroxilos fenólicos libres, y la que mayor degradación de lignina experimenta en estas condiciones.

BIBLIOGRAFIA

- Browing B.L. Methods of Wood Chemistry. 717-726, Interscience Publishers, New York, Vol II, 1967.
- Aulin-Erdtman G. Svensk Papperstidning. Spectrographic Contributions to Lignin Chemistry. IV. A Method for the Elucidation and Estimation of Phenolic Elements. 56, No. 8, 287-291, April 30, 1953.

3. Aulin-Erdtman G. Chemistry and Industry. The Application of $\Delta\epsilon$ Curves to Chemical Problems. 581-582, May 21, 1955.
4. Goldschmid O. Analytical Chemistry, 26, 1 421, 1954.
5. Aulin-Erdtman G. Svensk Papperstidning Spectrographic Contributions to Lignin Chemistry. VII. The ultra-violet absorption and ionization $\Delta\epsilon$ curves of some phenols. No. 18, 671-681, September 30, 1957.

6. Aulin-Erdtman G. Svensk Papperstidning. Spectrographic Contributions to Lignin Chemistry. III. Investigations on Model Compounds. 56, No. 3, 91-101, February 15, 1953.
7. Sorvari J., Sjöstrom E., Klemola A. and Laine J.E. Wood Science and Technology, 20, 35, 1986.

HBsAg MONOCLAS

JUEGO MICROELISA PARA LA CLASIFICACION EN SUBTIPOS "ad-ay" DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE DE LA HEPATITIS B

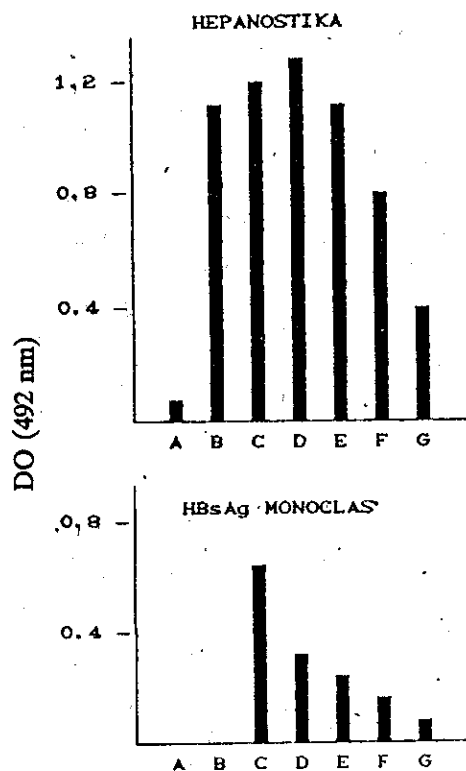
Argumentación: El antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (HBsAg) es un eficiente marcador de la infección por este agente. En este antígeno se han descubierto subtipos cuya aparición tiene importancia epidemiológica en el control de grupos de riesgo y en el seguimiento de focos de infección.

El juego "HBsAg MONOCLAS" permite conocer con un determinado margen de error si una muestra de suero o plasma previamente identificada como HBsAg positiva pertenece al subtipo "ad" o al subtipo "ay".

Fundamentación técnica: El inmunoensayo empleado es de tercera generación tipo microELISA heterogéneo directo que incluye un anticuerpo monoclonal de ratón de clase IgG₁ que reconoce al subtipo "ad" del HBsAg y no al subtipo "ay" bajo ciertas condiciones experimentales definidas en el ensayo.

CARACTERISTICAS MAS IMPORTANTES

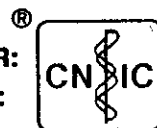
- **Fase sólida:** Placas de clouro de polivinilo de 96 pocillos de microtitulación.
- **Anticuerpo monoclonal CN-A₁** purificado mediante cromatografía de afinidad en Proteína A-Sepharose.
- **Volumen de reacción:** 100 μ L.
- **Sensibilidad:** 100 ng de HBsAg "ad"/100 μ L de suero.
- **Precisión:** Coeficiente de variación inter e intra-ensayo inferior al 5 %.
- **Especificidad:** 95 % contra juego diagnóstico "Hepanostika" de Organon Teknika para el HBsAg.



Clasificación del HBsAg con anticuerpos monoclonales en comparación con un juego diagnóstico comercial

- A: Suero humano normal
- B: Suero humano "AY"
- C: Suero humano "AD"
- D: Suero humano "AD" 1:164
- E: Suero humano "AD" 1:128
- F: Suero humano "AD" 1:256
- G: Suero humano "AD" 1:512

PRODUCIDO Y EXPORTADO POR:
PRODUCED AND EXPORTED BY:



Centro Nacional de Investigaciones Científicas
Avenida 25 y calle 158, Cubanacán, Playa
Ciudad de La Habana, Cuba
Apartados Postales 6880 y 6990
Teléfono: 21 8066 Télex: 51 1582 CNIC CU