

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 137**

21 Número de solicitud: 201600325

51 Int. Cl.:

B27K 3/15 (2006.01)

B27K 3/52 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

25.04.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

25.10.2017

71 Solicitantes:

UNIVERSIDADE DE VIGO (100.0%)
Campus Universitario s/n
36310 Vigo (Pontevedra) ES

72 Inventor/es:

FERNÁNDEZ COSTAS, M^a Del Carmen;
SANROMÁN BRAGA, María Ángeles y
MOLDES MOREIRA, Diego

54 Título: **Procedimiento enzimático para conferir a la madera y productos derivados resistencia frente a agentes de origen biótico**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un procedimiento enzimático para conferir a la madera y derivados de la misma resistencia frente a agentes bióticos. La invención consiste en el atrapamiento de un protector hidrosoluble en el entramado formado por lignina Kraft sobre la superficie de la madera y derivados gracias a la acción de enzimas de tipo lacasa. Es recomendable que los materiales a tratar se sometan a una etapa previa de acondicionamiento. A continuación, estos se impregnan con una mezcla formada por las disoluciones de lacasa, protector hidrosoluble y lignina Kraft mediante los métodos convencionales de impregnación química industriales (pulverización, pincelado, inmersión, autoclave, etc) para finalmente realizar un secado de los mismos. Como ventaja, disminuye la lixiviación del protector y los productos finales tratados pueden colocarse en escenarios de riesgo de alta humidificación con un menor impacto para el medioambiente y la salud humana.

ES 2 639 137 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento enzimático para conferir a la madera y productos derivados resistencia frente a agentes de origen biótico.

5

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un procedimiento enzimático cuyo objetivo es conferir a la madera y productos derivados resistencia frente a agentes biológicos capaces de deteriorarlos tales como bacterias, algas, hongos, insectos y xilófagos marinos. Su aplicación pertenece, por tanto, al sector maderero y dentro del mismo, al ámbito de la protección de la madera y derivados frente a agentes biológicos.

10

Antecedentes de la invención

15

La madera es un material no homogéneo, formado por células especializadas en tejidos y destinados principalmente a la realización de las funciones de transporte, soporte y almacenaje cuando está en el árbol" (Rodríguez Barreal, J.A.; 1998, *Patología de la madera*, Ed. Mundi-Prensa). Por derivados de la madera se entienden los productos que no se obtienen directamente del corte de los troncos, sino a partir de virutas, láminas o fibras de madera. Entre ellos estarían las maderas prefabricadas (tableros) y los materiales celulósicos (papel, cartón y afines). Para el caso de la madera maciza y de las maderas prefabricadas, dado su uso estructural, existe un gran interés en asegurar su buen estado a lo largo de su vida útil.

20

25

La madera presenta una durabilidad natural, es decir, una resistencia inherente frente al ataque de organismos destructores, y que varía mucho de unas especies a otras. Sin embargo, las características medioambientales del lugar en donde se coloque, darán lugar a diferentes "clases de riesgo" para la madera. Estas "clases de riesgo" se han definido en función del grado de humedad existente en el lugar de ubicación y se recogen en la norma europea EN-335: 1992. Estas "clases de riesgo" están vinculadas, además, a la exigencia o no de aplicar un tratamiento protector a la madera. Para el caso de escenarios con riesgo de alto grado de humedad, y en función de la durabilidad natural de la madera, se hace necesario un tratamiento protector. Una vez tratada, la madera adquiere una nueva durabilidad en función de la impregnabilidad de la misma (según norma europea EN-350-2: 1995) y la penetración y retención del protector (según norma europea EN-351-1: 2008). Estos tratamientos que incrementan la vida útil de la madera, entrañan una gran importancia, en primer lugar, para evitar graves pérdidas económicas y, en segundo lugar, porque contribuyen a incrementar la confianza de la sociedad en el uso de los materiales madereros.

30

35

40

A día de hoy, son los tratamientos de impregnación química los más efectivos y económicamente viables. Históricamente, los protectores hidrosolubles se han empleado ampliamente para proteger la madera. Se trata de disoluciones acuosas de sales minerales que pueden incluir coadyuvantes (compuestos que confieren otras propiedades además de las protectoras tales como propiedades retardantes, antifotodegradantes o fijadoras de los compuestos activos a la madera). La concentración del principio activo varía en función del grado de protección deseado y su naturaleza. Entre ellas nos encontramos con sales de arsénico, cobre, zinc, mercurio, boro y cromo. El cobre es uno de los más empleados, ya que es efectivo frente a hongos de la podredumbre blanda, para la cual pocas formulaciones son efectivas. El arseniato de cobre cromado (CCA) ha representado una excelente solución gracias a su eficacia frente a hongos, alto grado de fijación y amplio espectro biológico (incluyendo hongos tolerantes al cobre). Sin embargo, en el año 2004 la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos empezó

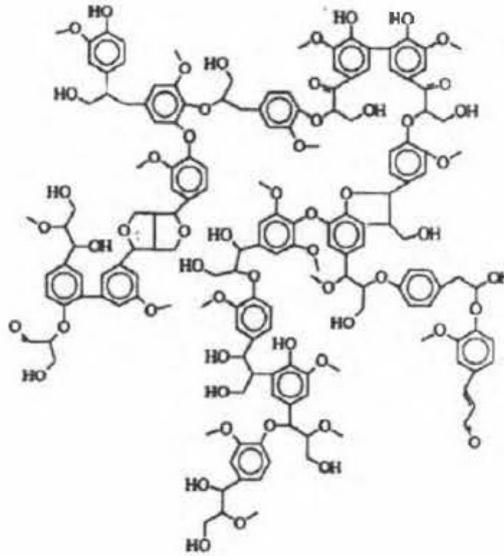
45

50

a restringir su uso para aplicaciones residenciales por consideraciones toxicológicas. Desde entonces, en el sector de la protección de la madera se han invertido grandes esfuerzos en la búsqueda de protectores alternativos, menos dañinos para el medioambiente y la salud humana; y con una baja lixiviación. Recientemente, destacan las formulaciones de cobre micronizado y sus aplicaciones, las cuales han dado lugar a un gran número de patentes (US2014234648 A1; US2009223408 A1; US2008286380 A1; US2013017271 A1; SG171470 A1; US 7632567 B1). Se trata de formulaciones en las que pequeñas partículas de compuestos de cobre se dispersan en un disolvente portador y que consiguen excelentes penetraciones en la madera. Estas partículas se cree se fijan a la madera con una fuerte unión, limitándose así su lixiviado y han demostrado una buena eficacia para tratar la madera (Freeman, M.H. *et al.*, 2008, *Forest Prod. J.* 58(11): 6-27). No obstante, existen autores que sostienen que la seguridad de estos protectores, al igual que su modo de acción, no es suficientemente clara y claman la necesidad de una evaluación de su impacto en el medioambiente y la salud humana (Civardi C. *et al.*, 2015, *Environmental Pollution* 200: 126-132).

Por otro lado, en los últimos años se ha abogado por la implementación de tratamientos acordes con la "Química verde" lo cual supone el empleo de procesos más limpios y sostenibles. En concreto, la biotecnología ha permitido desarrollar un gran número de aplicaciones industriales basadas en este concepto. En particular, los tratamientos enzimáticos se han incorporado a muchas aplicaciones para la modificación de materiales lignocelulósicos, siendo las lacasas las enzimas más ampliamente usadas (Widsten P. *et al.*, 2008, *Enzyme Microb Tech* 42: 293-307; Kalia S. *et al.*, 2014, *J Molec Catal B* 102: 48-58). Cabe destacar el trabajo de Silva *et al.* (2001, *React Funct Polym* 71: 713-720) en el que se logró conferir propiedades antimicrobianas y antioxidantes a fibras de lino mediante funcionalización con enzima lacasa. Análogamente, Oriol *et al.* (2015, *Cellulose*, 22: 2375-2390) han desarrollado un procedimiento para dotar a la celulosa de capacidad antioxidante mediante productos modificados enzimáticamente. Además, existen diversas patentes basadas en los mencionados procesos enzimáticos. Se ha empleado grafting (o injerto) enzimático para desarrollar filtros de celulosa (KR101300076 B1), para conferir propiedades hidrófobas a materiales de madera (ES2525363 A1), conferir propiedades ignífugas a paja de maíz (CN102975270 B) o fabricar papel con encolado interno (WO2011009979 A1), entre otros.

Las lacasas son enzimas que permiten oxidar sustratos fenólicos y anclarlos de modo estable a la madera, ya que la propia lignina de la madera posee grupos fenólicos que pueden actuar como puntos de anclaje (Fernández-Fernández M. *et al.*, 2014, *Wood Sci Tech*, 1: 151-160). La lignina es un polímero presente en la pared celular de plantas vasculares y algunas algas. A continuación, se muestra la estructura propuesta para la lignina por Adler (1977, *Wood Sci Technol*, 11: 169-21):



Su estructura, compleja y heterogénea, se compone de subestructuras con un peso molecular de aproximadamente 10000 uma, interconectadas entre sí.

5

La lignina se encuentra de modo natural en la madera pero, además, supone un problema en la industria de la pasta de papel, ya que se genera como subproducto en ingentes cantidades. En la producción de pasta de papel el proceso dominante actualmente es el proceso Kraft, que permite convertir madera en pasta de celulosa gracias al empleo de hidróxido de sodio y sulfuro de sodio. Simultáneamente, se genera un subproducto, el licor negro, que contiene una elevada concentración de ligninas residuales. Estas últimas se caracterizan por tener una estructura muy degradada debido al proceso Kraft. La mayoría de las industrias de papel que emplean el mencionado proceso emplean el licor negro para producir energía a través de su combustión y suplir las necesidades energéticas de la propia industria. No obstante, esos subproductos podrían emplearse para generar productos de alto valor añadido. Por ello, en el marco de una "Química verde" se podrían extraer compuestos de interés del licor negro, tales como las ligninas, y revalorizarlos.

10

15

20

Hasta el momento, el empleo de lignina en la formulación de otros compuestos no ha alcanzado un gran éxito debido a las limitaciones de los productos obtenidos. Sin embargo, el interés por valorizar este residuo y reducir su impacto ambiental no ha cesado y el desarrollo de materiales basados en lignina ocupa una de las mayores preocupaciones dentro del sector forestal. En efecto, se han desarrollado patentes de polímeros que contienen lignina o bien composiciones incluyendo polímeros de lignina (US2015368546 A1). Las ligninas Kraft, además, han demostrado su utilidad para la formación de microcápsulas por medio de ultrasonidos con la capacidad de transportar y liberar moléculas hidrofóbicas (Tortera *et al.*, 2004, *Biomacromolecules*, 15, 1634-1643). Por otro lado, existen estudios preliminares que han demostrado que la propia lignina podría ser un potencial agente para la protección de la madera (Chirkova J., 2010, *Holzforschung*, 65: 497-502).

25

30

Las estrategias enzimáticas, a pesar de su potencialidad, han sido empleadas en escasas aplicaciones dentro del sector de la protección de la madera. Destaca la aportación de Räittö *et al.* (2004, *Holzforschung*, 58: 440-445), la cual ha demostrado la efectividad de esta estrategia para unir establemente fenoles (vanilina y ácido tánico) a la madera y, de este modo, protegerla frente a hongos. La misma estrategia, pero para potenciar las propiedades antibacterianas, ha sido empleada para funcionalizar

35

materiales lignocelulósicos con taninos (Widsten *et al.*, 2010, *Process Biochem*, 45: 1072-1081), procedimiento que, además, se ha patentado (EP2199046 A1). Finalmente, cabe mencionar la patente NZ505242 (A) que engloba un método para tratar la madera con compuestos metálicos y lignina basado en la oxidación y/o macromolecularización de la lignina o derivados de la misma. En esta, se utiliza una estrategia basada en el empleo de agentes alcalinizantes, cuya acción está catalizada por fenol-oxidantes y acelerada mediante calentamiento a temperaturas en un rango de 20-300°C. A pesar de su potencialidad y ventajas, la aplicación industrial hasta el momento de estas estrategias es baja a causa de sus condiciones operacionales. En consecuencia, para la protección de la madera se precisan nuevas metodologías más eficientes, sencillas y de fácil aplicación a nivel industrial.

Explicación de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento basado en la utilización de enzimas de tipo lacasa y que representa un tratamiento protector preventivo para la madera y productos derivados que se podrá aplicar antes o después de su puesta en servicio para evitar que sean atacados por agentes biológicos capaces de deteriorarlos. Dado que la humedad sería uno de los factores clave en el desarrollo de los mencionados agentes, se ha considerado un escenario de riesgo de humidificación, es decir, el correspondiente a un uso de la madera correspondiente a una "clase de riesgo" 3 o superior según la norma EN-335:1992. El presente procedimiento se basa en el empleo de lignina Kraft en conjunción con lacasa para crear *in situ* una red tridimensional polimérica en la que, simultáneamente, se encapsularían protectores hidrosolubles, de modo que resistan al lixiviado. En particular, estos protectores hidrosolubles comprenden disoluciones acuosas de sales minerales que pueden contener arsénico, cobre, cinc, boro o cromo o mezclas de las mismas.

Los materiales a tratar se deben someter a una etapa previa de acondicionamiento, dicho acondicionamiento es un paso previo y recomendado para obtener los mejores resultados en el tratamiento realizado con el presente procedimiento. No obstante, en función de las condiciones del material de partida, implicara una serie de fases. A continuación, se describe el protocolo completo de tareas que variará en función del material de partida a tratar:

- a) Cuando se trata de una pieza de madera maciza procedente directamente de un tronco comprende diferentes operaciones de mecanizado así como secado antes del tratamiento de protección y/o impregnación, en concreto, consiste en las siguientes etapas:
 - 1) Descortezado y tronzado. La ausencia de corteza es deseable ya que ésta repercute negativamente al actuar de barrera física a la penetración del tratamiento y dificultar el posterior secado.
 - 2) Incisionado superficial. En el caso de maderas de baja permeabilidad, se aconseja la realización de un incisionado superficial para conseguir un mayor grado de penetración del tratamiento protector.
 - 3) Corte a medida para obtener las dimensiones finales. Para un tratamiento efectivo, se recomienda como última premisa, que la madera a tratar tenga las dimensiones finales deseadas antes del tratamiento de protección por impregnación. En el caso de madera, las probetas tendrán las mismas dimensiones que la manufactura final.

4) Secado. La madera tendrá, preferiblemente, un contenido de humedad inferior al 16-18%, de modo que no exista agua libre en los lúmenes celulares y los compuestos activos puedan penetrar correctamente en la fase de impregnación. Con estos contenidos de humedad se minimizan además los riesgos de ataques de organismos xilófagos durante su almacenamiento. El secado se puede realizar al aire (secado natural) hasta alcanzar una humedad de equilibrio con la exterior del aire; mediante un secado artificial empleando técnicas convencionales tales como el secado por inmersión, al vacío, por vaporización o por bomba de calor, o bien, se puede llevar a cabo un secado mixto combinando el secado natural y el secado artificial.

b) Para el caso de derivados de madera, el acondicionamiento se limita al secado de los materiales lignocelulósicos de partida para obtener una humedad inferior al 18%, previamente a la obtención de los derivados deseados. Además, serán los materiales lignocelulósicos de partida los que serán tratados previamente a su procesado para la obtención del producto deseado (tableros, cartón, etc).

A continuación, éstos se impregnan con una mezcla compuesta por las disoluciones acuosas de lacasa, la disolución del protector hidrosoluble y la disolución de lignina Kraft.

Finalmente, los materiales impregnados se someten a un secado final a temperatura ambiente para fijar los principios activos gracias a la actividad oxidante del oxígeno y para eliminar el agua introducida. No obstante, si las circunstancias lo requieren se puede realizar otro tipo de secado, tal y como se ha descrito anteriormente para la etapa de acondicionamiento.

La presente invención difiere, por su simplicidad, de otras metodologías enzimáticas que involucran metales y ligninas tales como la descrita en la patente NZ505242 (A) en la que se emplean reactivos alcalinizantes y reacciones aceleradas por temperatura. Por el contrario, el presente procedimiento opera a pH moderados (entre 4-8) y no emplea reactivos alcalinizantes. Estos implican una basificación del medio de reacción, con el consecuente riesgo de deterioro en la madera a tratar. Además, pH superiores a 8 impiden que un tratamiento basado en enzimas lacasas sea efectivo debido a la pérdida de actividad y/o desnaturalización de la enzima. La utilización de disoluciones alcalinas en el tratamiento de la madera puede provocar una alteración de la misma y favorecer la disolución de la lignina y de la hemicelulosa. Por otro lado, el presente procedimiento emplea enzimas lacasas y por ello las reacciones serán catalizadas por oxígeno y no requieren temperaturas elevadas. Finalmente, el presente procedimiento se basa en el empleo de ligninas Kraft, cuya particular estructura, permite una mayor eficiencia en el proceso enzimático respecto a otro tipo de estructuras. De este modo, se reducen el número de etapas y reactivos empleados con respecto a invenciones previas. Asimismo, el presente procedimiento es compatible con los procesos convencionales de impregnación industriales gracias a sus condiciones operacionales y permite la valorización de un residuo de la industria papelera.

Del procedimiento descrito, se desprenden dos ventajas principales en su uso como protector de la madera:

- Se disminuye el lavado o lixiviación de las sales metálicas presentes en la formulación del protector hidrosoluble al medio circundante, disminuyéndose así el riesgo para la salud humana y el impacto medioambiental.
- El tratamiento resulta efectivo para proteger la madera y productos derivados durante un período de tiempo superior y en ambientes adversos.

En una realización particular, como enzima para llevar a cabo el procedimiento enzimático se emplean enzimas del tipo lacasas, EC 1. 10. 3. 2, enzimas pertenecientes al grupo de las oxidasas de cobre azul, capaces de iniciar una reacción radicalaria en la cual sustratos con potenciales redox inferiores a 1V (ligninas, principalmente, en la presente invención) serán oxidados con la subsecuente reducción de oxígeno molecular a agua. Dado que las reacciones transcurren en fase acuosa, el propio oxígeno disuelto en la disolución será el responsable de promover la reacción enzimática. Sin embargo, se ha reportado que el aporte de oxígeno externo en reacciones mediadas por lacasas reduce el tiempo de incubación (Ortner *et al*, 2015, *Process Biochemistry* 50, 1277-1283).

En una realización particular, como protectores hidrosolubles se pueden emplear disoluciones acuosas conteniendo compuestos metálicos que puedan ser atrapados en la red tridimensional polimérica de lignina Kraft. Preferentemente se utilizarán disoluciones acuosas de sales metálicas que pueden contener arsénico, cobre, cinc, boro o cromo y/o mezclas de las mismas.

En una realización particular, se empleara lignina Kraft procedente del licor negro obtenido como residuo en el proceso Kraft para llevar a cabo el atrapamiento del protector hidrosoluble. Este licor es de pH alcalino y por ello, contiene ligninas solubles, que podrán ser obtenidas por precipitación de las mismas mediante acidificación. Las ligninas empleadas en el presente procedimiento pueden tener diferentes orígenes. Pueden proceder directamente de la industria o haber sido modificadas químicamente. Estas son generadas en grandes cantidades en la industria papelera y su empleo conllevaría así la revalorización de un residuo. Además, su estructura altamente degradada y concentración fenólica (Fernández-Costas *et al.*, 2014, *Biomass and Bioenergy*: 63, 156-166) la convierten en un sustrato muy apropiado para la aplicación del presente procedimiento.

La lignina Kraft podrá tener un tamaño polimérico muy variable en función de su origen y, en consecuencia, una solubilidad también muy variable. Por ello, aunque se recomienda trabajar con altas concentraciones de lignina Kraft para conseguir un mayor entramado que atrape las sales metálicas, en muchos casos, será la propia solubilidad de la lignina Kraft la que marque la máxima concentración posible susceptible de ser utilizada en el presente procedimiento.

La mezcla acuosa de las disoluciones de protector hidrosoluble, lacasa y lignina Kraft se realiza de modo previo a la etapa de impregnación. De este modo, la reacción enzimática comienza a actuar justo en el momento previo al contacto con la madera. Una vez se adicione la mezcla a la madera o productos derivados a tratar, comenzará a desarrollarse el entramado tridimensional en el que los principios activos del protector hidrosoluble quedarán atrapados en el entramado polimérico de lignina Kraft y, de manera simultánea, se producirá el entrecruzamiento con la propia lignina presente en la madera. El propio oxígeno disuelto en la mezcla será el responsable del desarrollo de la reacción, sin embargo, tal y como se ha comentado previamente, se podría adicionar de modo externo con el fin de disminuir el tiempo de impregnación.

La impregnación se desarrolla a temperaturas que no pueden superar los 70°C, ya que a temperaturas superiores, la actividad enzimática de las lacasas se verla ya gravemente afectada y, en consecuencia, el entrecruzamiento de la lignina Kraft y su unión a la madera.

Las condiciones operacionales del presente procedimiento son suaves y, además, compatibles con los métodos convencionales de aplicación de tratamientos químicos de la madera, tanto tratamientos superficiales (pincelado, pulverizado, inmersión breve)

como tratamientos en profundidad convencionales, sin necesidad de su adaptación. Por otro lado, la formulación propuesta es de base acuosa, por lo que es de fácil manejo y baja peligrosidad para los operarios.

5 Finalmente, una vez la madera se encuentre impregnada, se permitirá una fase de secado para finalizar las reacciones enzimáticas. En una aplicación particular, el secado se realiza por uno de los métodos convencionales (secado natural, artificial o mixto) hasta alcanzar un valor de humedad igual o inferior al 18%. Este proceso conlleva no sólo la
10 retirada del agua procedente del medio de reacción, sino que además constituye una manera de incrementar la concentración de oxígeno sobre la interfase líquida de reacción. Este último factor es clave dado que se ha demostrado la importancia de aportar oxígeno a las reacciones mediadas por lacasas para asegurar la completa oxidación de diferentes tipos de ligninas (Ortner *et al.*, 2015, *Process Biochemistry*: 50, 1277-1283).

15 En otro aspecto, la invención descrita se refiere al uso del tratamiento y procedimiento anteriormente descritos para la protección de la madera y derivados frente a agentes bióticos tales como bacterias, algas, hongos, insectos y xilófagos marinos.

20 **Breve descripción de los dibujos**

La descripción se complementa con un juego de dibujos de carácter ilustrativo y no limitativo, donde se ha representado lo siguiente:

25 Figura 1. Diagrama esquemático simplificado del procedimiento enzimático para conferir a la madera resistencia frente a agentes de origen biótico basado en un método de impregnación a vacío. Una probeta de madera seca se somete a vacío para eliminar el aire contenido en su estructura interna en la cámara de tratamiento (a). A continuación, y bajo vacío, se introduce la mezcla de disolución de lignina Kraft, protector hidrosoluble y
30 lacasa (b). Esta mezcla se prepara previamente a la impregnación. Tras el periodo de impregnación, la cámara de tratamiento torna a presión atmosférica para finalmente escurrir la probeta y dejarla secar al aire (c).

35 Figura 2. Concentración de cobre total lixiviada tras someter probetas de madera de *Pinus sylvestris* tratadas, durante 14 días de inmersión en agua con 7 cambios de agua. El tratamiento convencional representa una impregnación acuosa con CuCl_2 25 mM, mientras que en el tratamiento enzimático se ha empleado la misma concentración de cobre pero adicionando además, la disolución de lignina Kraft (20% en peso seco) y enzima lacasa (50 U/g de madera seca).

40 **Realización preferente de la invención**

Procedimiento para conferir a la madera y productos derivados de la madera resistencia frente a agentes de origen biótico junto con una alta fijación de los compuestos activos
45 caracterizado por comprender el atrapamiento de protectores hidrosolubles en una red polimérica de lignina Kraft unida a la madera empleando un mecanismo enzimático siguiendo las siguientes etapas:

50 a) Acondicionamiento del material para el tratamiento, paso previo recomendado que consiste en el pre-tratamiento normal de la madera antes de cualquier proceso de impregnación química que incluye etapas de limpieza, mecanizado (descortezado, incisionado, corte a medida) y secado.

- b) Preparación previa de las disoluciones individuales de lignina Kraft, protector hidrosoluble y lacasa.
- 5 c) Impregnación de la madera que comprende la adición simultánea de la mezcla de las disoluciones de lignina Kraft, protector hidrosoluble y lacasa.
- d) Secado de las muestras impregnadas.

10 Como paso previo a la impregnación, se prepararán por separado las disoluciones de lignina Kraft, protector hidrosoluble y lacasa.

15 La disolución de lignina Kraft se preparará en una disolución tamponada en un intervalo de pH de 4-8 y con una concentración que puede variar entre un 1 y un 40% de lignina referido a base de madera o material lignocelulósico de partida secos.

20 En el caso de la disolución de protector hidrosoluble se emplearán disoluciones que contengan sales metálicas que incluyan en su composición arsénico, cobre, cinc, boro o cromo y/o mezclas de las mismas. La concentración de las mismas dependerá de la madera tratada, el grado de protección que se desee obtener y el método empleado para la impregnación (superficial o en profundidad). No obstante, las muestras tratadas deberán superar, una vez finalizado el tratamiento, los criterios de aceptabilidad de la norma europea EN-599: 2009+A1:2013. Se este modo, se identificaría la cantidad mínima eficaz de producto en g/m^2 para tratamientos superficiales y en kg/m^3 para tratamientos en profundidad.

25 La impregnación tiene lugar a temperatura ambiente o temperaturas que no superen los 70°C y se puede llevar a cabo mediante las metodologías convencionales de modo superficial tales como pincelado, pulverizado, inmersión breve; o en profundidad tales como inmersión prolongada, inmersión caliente y fría o tratamientos con autoclave.

30 La dosis de lacasa, varía en función de la tipología del tratamiento. En tratamientos superficiales tales como pincelado o pulverizado se adicionarán actividades enzimáticas de 0.1-50 U/mL de medio de reacción. En cambio, en tratamientos en profundidad de la madera y productos derivados, estos se impregnarán inmersos en el medio de reacción y se emplearán actividades enzimáticas de 1-100 U/g de madera o material lignocelulósico secos. Se define una unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima que oxida un $1 \mu\text{mol}$ de 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sultánico (ABTS) por minuto. La actividad enzimática se determina espectrofotométricamente monitorizando la oxidación del ABTS como sustrato ($\epsilon_{436}=29300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a pH 7 (tampón fosfato, 0.1 M).

35 La disolución de enzima lacasa puede ser el propio preparado comercial. En caso de requerirse una menor actividad, o por facilidad de trabajo, se puede trabajar con diluciones del preparado comercial. En este último caso será necesario diluir la enzima en un medio tamponado a pH 4-8. La reacción enzimática de polimerización de ligninas Kraft, tal y como se ha mencionado previamente, puede ser acelerada por la presencia de oxígeno. No obstante, para el presente procedimiento no es estrictamente necesario un

40 aporte externo.

45

50 Si la aplicación se realiza mediante pincelado suele requerir 3 manos (permitiendo un secado entre ellas) para alcanzar penetraciones similares al pulverizado. En cuanto a la inmersión breve, esta conlleva una inmersión de los materiales a tratar de un período que puede durar varios segundos hasta un máximo de 10 minutos. En estos tratamientos superficiales se alcanzan penetraciones máximas de 3 mm en madera, por ello, para mayores penetraciones se emplearán tratamientos en profundidad. En cambio sí se emplea tratamientos en profundidad se emplearán tiempos de impregnación de 10

minutos como mínimo y que pueden llegar hasta 24 horas, en función del volumen de material a tratar y la impregnabilidad de la especie maderera.

5 Con la intención de mostrar la presente invención de un modo ilustrativo aunque en ningún modo limitante, se aporta el siguiente ejemplo práctico de la invención propuesta:

En primer lugar, se lleva a cabo el acondicionamiento de los materiales. Madera de *Pinus sylvestris* y *Fagus sylvatica* fue descortezada y se seleccionó una sección correspondiente a la albura, que después se sometió a secado hasta alcanzar una
10 humedad del 18%. Finalmente, se cortaron bloques de dimensiones 30 x 10 x 5 mm³.

A continuación se llevó a cabo el proceso de impregnación siguiendo un protocolo modificado del estándar europeo EN 113: 1997. Las probetas con una humedad inferior al 18% se introdujeron en la cámara de impregnación y se aplicó un vacío de 0.7 kPa
15 durante 15 min (Fig. 1.a). A continuación, se prepara la mezcla de disolución de lignina Kraft, la disolución de protector hidrosoluble y la disolución enzimática con la concentración requerida. Se mezclaron la disolución de lignina Kraft al 20% respecto al peso de madera seca, la disolución de CuCl₂ 25 mM y 50 U de enzima por g de madera seca. La disolución de lignina Kraft se ha mantenido a un pH 7 empleando un tampón
20 fosfato al 0.1 M. Después, bajo vacío, se introdujo la anterior mezcla y se llevó a cabo la impregnación durante 10 minutos (Fig. 1.b). Finalmente, las probetas se han dejado secar al aire a temperatura ambiente y durante 24 horas para finalizar el tratamiento (Fig. 1.c).

Un lote de las muestras tratadas se ha sometido a un envejecimiento acelerado según la
25 norma europea EN-84: 1997 (pero con 7 cambios de agua) con el objetivo de evaluar la lixiviación del cobre a lo largo del tiempo. Este estudio de lixiviación permitirá demostrar la efectividad del tratamiento en la fijación de la sal metálica a la madera. Las retenciones de cobre obtenidas en las probetas de *P. sylvestris* para ambos tratamientos: enzimático con lignina Kraft (propuesto en la presente invención) y convencional, se muestran en la
30 siguiente tabla:

TRATAMIENTO	[Cu] (mg/kg) (tras la impregnación)	[Cu] (mg/kg) (tras el envejecimiento)
Convencional	2670	1560
Enzimático con lignina Kraft	2470	1600

35 Se han encontrado retenciones ligeramente superiores para el tratamiento convencional, no obstante, tras el lavado los valores son incluso inferiores al tratamiento con el presente procedimiento. En consecuencia, en el tratamiento convencional el cobre se ha lixiviado en mayor medida y ha pasado al medio acuoso circundante. La Fig. 2 refleja que las maderas de *P. sylvestris* tratadas mediante el presente procedimiento enzimático presentan desde el primer momento, un menor lixiviado del cobre con respecto a un
40 tratamiento convencional con una sal metálica de cobre. Como ventajas, se obtiene una disminución de la lixiviación y, por tanto, un menor impacto ambiental del tratamiento junto con un aumento de la vida útil de la madera tratada.

Además, los especímenes de madera de *P. sylvestris* y *F. sylvatica* se han testado frente
45 al ataque fúngico de *Coniophora puteana* y *Trametes versicolor*, respectivamente, durante a semanas y se ha analizado su pérdida de masa para evaluar la eficacia del tratamiento. También, se ha realizado un control de probetas sin tratar para asegurar la

virulencia de las cepas. Los resultados obtenidos aparecen reflejados en la siguiente tabla:

TRATAMIENTO	N*	Pérdida de Masa (%) (<i>C. puteana</i>)	N*	Pérdida de Masa (%) (<i>T. versicolor</i>)
Control de virulencia	35	31 (9)	21	20 (4)
Convencional	9	9 (5)	5	7 (3)
Enzimático con lignina Kraft	9	11 (4)	5	3 (3)

*Número de replicas

5

Entre paréntesis se han indicado las desviaciones estándar. El control de virulencia supera el 20%, por lo que el ensayo es aceptable según la norma EN-113: 1997. Los valores similares obtenidos en cuanto a pérdida de masa para el tratamiento propuesto y el tratamiento de cobre acuoso muestran la viabilidad del tratamiento propuesto y la bioaccesibilidad del cobre para el hongo, a pesar de su mayor resistencia al lixiviado.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para conferir a la madera y productos derivados de la madera resistencia frente a agentes de origen biótico **caracterizado** por comprender el atrapamiento de un protector hidrosoluble en una red polimérica de lignina Kraft que se une a la madera empleando un mecanismo enzimático siguiendo las siguientes etapas:
- 10 a) Acondicionamiento previo del material comprenderá operaciones de limpieza, mecanizado (descortezado, incisionado, corte a medida) y secado que variara según el tipo de madera.
- 15 b) Preparación previa de las disoluciones de lignina Kraft, protector hidrosoluble y lacasa por separado.
- 20 c) Impregnación de la madera que comprende la adición simultanea de una mezcla con la disolución de lignina Kraft, protector hidrosoluble y lacasa a temperatura ambiente.
- d) Secado de las muestras impregnadas mediante métodos convencionales (secado natural, artificial o mixto) hasta alcanzar un valor de humedad igual o inferior al 18%.
- 25 2. Procedimiento según reivindicación 1, **caracterizado** porque la disolución de protector hidrosoluble a preparar según la etapa b) contenga sales metálicas que incluyan en su composición arsénico, cobre, cinc, boro o cromo y/o mezclas de las mismas, y en una concentración adecuada a la clase de uso y tipo de madera y que permita superar los criterios de aceptabilidad de la norma europea EN-599: 2009+A1:2013.
- 30 3. Procedimiento según reivindicación 1, **caracterizado** porque la disolución de lignina a preparar según la etapa b), se lleva a cabo en disolución tamponada a un pH comprendido entre 4-8 y concentración comprendida entre 1-40% por g madera o material lignocelulósico seco.
- 35 4. Procedimiento según reivindicación 1, **caracterizado** porque la disolución de lacasa según la etapa b), se puede emplear de modo directo del preparado comercial o diluida en una disolución tamponada a pH entre 4-8.
- 40 5. Procedimiento según reivindicación 1, **caracterizado** porque la etapa e) de impregnación se puede llevar a cabo de modo superficial (pincelado, pulverizado, inmersión breve) o en profundidad (inmersión prolongada, inmersión caliente y fría o tratamientos con autoclave).
- 45 6. Procedimiento según reivindicaciones 1 y 5, **caracterizado** porque la etapa e) de impregnación puede tener una duración inferior a 10 minutos para los tratamientos superficiales y una duración comprendida entre 10 min - 24 horas para el caso de tratamientos en profundidad, en función del método de impregnación seleccionado, especie de madera y dimensiones de la misma.
- 50 7. Procedimiento según reivindicaciones 1 y 4 a 6, **caracterizado** porque para el caso de impregnación mediante pulverizado y pincelado se preparará una disolución de lacasa con una actividad enzimática comprendida entre 0.1-50 U/mL.
8. Procedimiento según reivindicaciones 1 y 4 a 6 **caracterizado** porque cuando se empleen métodos de impregnación en profundidad se preparara una disolución de lacasa

con una actividad enzimática comprendida entre 1-100 U/g de madera o material lignocelulósicos secos.

- 5 9. Procedimiento según reivindicaciones 1 y 5 a 8, **caracterizado** porque la temperatura en la etapa e) no superará los 70°C.
10. Procedimiento según reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque el mecanismo enzimático es acelerado y/o potenciado por oxígeno.
- 10 11. Uso del procedimiento descrito según reivindicaciones 1 a 10, como tratamiento protector de la madera y derivados frente a agentes bióticos tales como bacterias, algas, hongos, insectos y xilófagos marinos.

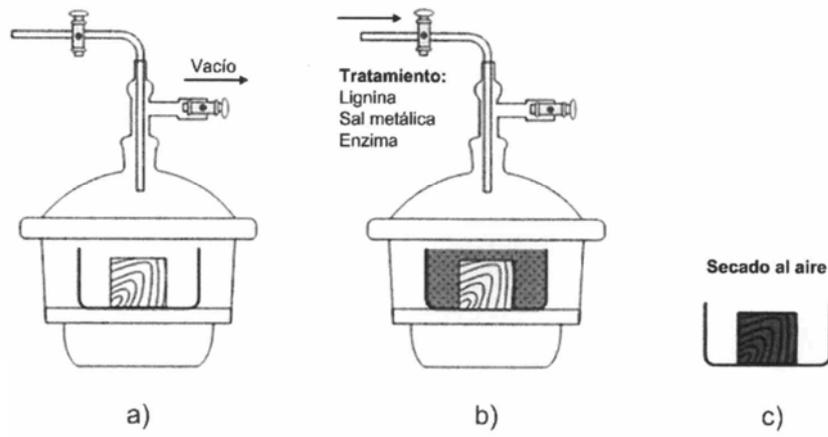


Figura 1.

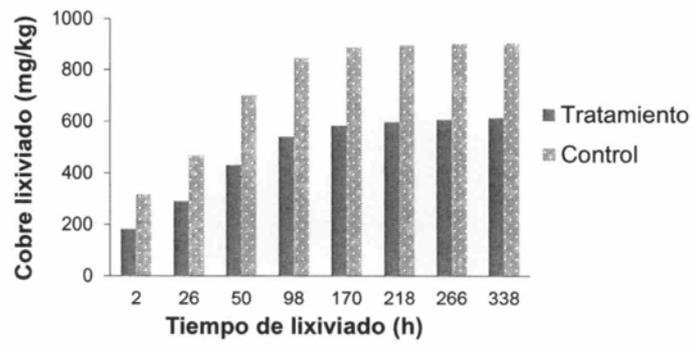


Figura 2.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201600325

②② Fecha de presentación de la solicitud: 25.04.2016

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **B27K3/15** (2006.01)
B27K3/52 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	EP 1034903 A1 (SHOWA DENKO KK SDS BIOTECH CORP) 13/09/2000, Párrafos [0017], [0024], [0025], [0038], [0089]-[0100], ejemplo 8.	1-11
A	WO 9816357 A1 (NOVO NORDISK AS et al.) 23/04/1998, Página 10, línea 26; reivindicación 9.	1-11
A	US 4752509 A (SIMONSON RUNE et al.) 21/06/1988, ejemplos.	1-11
A	WO 2015168456 A1 (ARCH WOOD PROTECTION INC) 05/11/2015, Párrafos [0010]-[0016].	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
25.01.2017

Examinador
M. C. Bautista Sanz

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

B27K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, Bases de datos de patentes de texto completo, XPESP, NPL, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.01.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-11	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 1034903 A1 (SHOWA DENKO KK SDS BIOTECH CORP)	13.09.2000
D02	WO 9816357 A1 (NOVO NORDISK AS et al.)	23.04.1998

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere a un procedimiento y su uso para conferir a la madera, y productos derivados de la misma, resistencia frente a agentes de origen biótico.

El documento D01 divulga un procedimiento protector de la madera frente a agentes de origen biótico que comprende el atrapamiento de un protector hidrosoluble (sal metálica) en una red polimérica de lignina que se une a la madera empleando un tratamiento enzimático mediante la acción de una oxidasa (lacasa). Entre los metales empleados están el cobre, el cromo o el cinc. La impregnación se lleva a cabo a temperaturas entre 40 y 150°C, pH entre 7 y 12 (preferentemente 8,5) y con métodos tales como pincelado, pulverización o inmersión. La impregnación puede hacerse con presión reducida o vacío y con el empleo de oxígeno. Ver párrafos [0017], [0038], [0089]-[0100], ejemplo 8.

La diferencia entre el documento D01 y el objeto de la reivindicación 1 es el empleo de lignina Kraft en la composición de impregnación de la madera. Dado que el estado de la técnica indica la posibilidad de usar otros tipos de lignina o sus derivados (ver D01: párrafos [0024],[0025]) así como la posibilidad de que el tipo de lignina sea Kraft (ver documento D02: página 10, línea 26 y reivindicación 9), se considera que la selección de lignina Kraft sería una alternativa que un experto en la materia seleccionaría sin esfuerzo inventivo dentro de las posibles ligninas mostradas en el estado de la técnica, cara a conseguir una buena protección de la madera frente a agentes bióticos.

Por lo tanto, la invención tal y como se define en la reivindicación 1 no cumple con el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1. Ley 11/1986 de Patentes).

En relación a las reivindicaciones 2 a 10, éstas no tienen características técnicas que en combinación con la reivindicación 1 de la que dependen, cumplan con el requisito de novedad y/o actividad inventiva ya que se trata de alternativas ya contempladas en el documento D01 o que derivan de él.

Asimismo, la reivindicación 11 (uso) no satisface con el requisito de actividad inventiva por los mismos motivos ya argumentados para la reivindicación 1.

En consecuencia, la invención tal y como se define en las reivindicaciones 1 a 11 no cumple con los requisitos de patentabilidad recogidos en el artículo 4 de la Ley 11/1986.