Prevención y tratamiento de la pudrición blanca de la madera mediante recubrimientos basados en oligómeros de quitosano

Iosody Silva-Castro[1], Agustín León Alonso-Cortés[2], Milagros Casados-Sanz[3], Luis Acuña-Rello[3], Pablo Martín-Ramos[4], Jesús Martín Gil[1]

[1]Laboratorio de Tecnología Ambiental, [2]Laboratorio de Biotecnología, [3]Laboratorio de Tecnología de la Madera; del Departamento de Ingeniería Agrícola y Forestal, Universidad de Valladolid, Avenida de Madrid 44, 34004 Palencia, España; [4]Departamento de Ciencias Agrícolas y Ambientales, Universidad de Zaragoza, Carretera de Cuarte s/n, 22071 Huesca, España.

Resumen

Los materiales naturales son una opción idónea para sustituir a los materiales sintéticos y así mitigar los efectos deletéreos que producen sobre el medio ambiente y la salud humana. En este trabajo se presentan los resultados de ensayos *in vitro* dirigidos a evaluar la eficacia de un recubrimiento a base de oligómeros de quitosano y su combinación con propóleo y nanopartículas plata frente al hongo de la pudrición blanca de la madera -*Trametes versicolor*- a través de dos modelos de ensayos. El primer ensayo realizado para determinar la concentración mínima inhibitoria, donde se alcanzaron porcentajes de inhibición de 100% con dosis de 5.0 mg/mL de quitosano y 0.5 mg/mL de propóleo, aplicados individualmente; y dosis de 2.0 mg/mL, 0.2 mg/mL y 2.0 µg/mL de quitosano, propóleo y nanoplata, respectivamente, en la mezcla triple. El segundo ensayo consistió en la aplicación del producto triple sobre trozos de madera de álamo (*Populus* spp.) inoculados con *T. versicolor*, para evaluar la eficacia del tratamiento como recubrimiento protector de la madera y se registró la degradación por FTIR.

Palabras clave: antifúngicos naturales, espectroscopía FTIR, efecto sinérgico, nanomateriales, *Trametes versicolor.*

1. Introducción

La madera estructural es susceptible a diversos tipos de biodegradación causada por insectos, bacterias y hongos. Estos últimos son los responsables de la pudrición blanca, parda y blanda, las enfermedades más importantes sobre decaimiento de la madera ya que provocan pérdida de resistencia por degradación de la celulosa y/o lignina de las paredes celulares [1]; no obstante, diferentes grupos de hongos generan diferentes tipos de degradación. El *Trametes versicolor* es un ascomiceto causante de la pudrición blanca, este es un hongo no selectivo, por lo tanto los constituyentes de las paredes celulares (lignina y carbohidratos estructurales) son consumidos a la vez generando una degradación homogénea [2].

La degradación de la madera estructural es normalmente combatida con tratamientos preventivos de recubrimientos elaborados a base de productos químicos, con alto contenido de aditivos y resinas en solventes orgánicos, los cuales pueden provocar efectos negativos en el medio ambiente a largo plazo, pero son muy tóxicos para los organismos acuáticos y nocivos para la salud humana [3].

El quitosano es un biopolímero, el segundo más abundante después de la celulosa, no tóxico, biocompatible y biodegradable con propiedades antifúngicas ampliamente estudiadas [4]–[6]. Su carácter catiónico por el grupo amino (NH_3^+) y los grupos OH^- del anillo de carbono le confieren facilidad de enlazarse a otros compuestos orgánicos y metálicos [7]. Por tanto, en el presente estudio se propone la formación de oligómeros de quitosano (con mayor actividad antifúngica) mezclados con propóleo y nanopartículas de plata (también con propiedades fungicidas) para combatir al patógeno *T. versicolor*; evaluando *in vitro* el grado de toxicidad por la concentración mínima inhibitoria y la protección que brinda a madera de *Populus* spp. a través de un seguimiento de la degradación por espectroscopía FTIR.

2. Materiales y Métodos

2.1 Reactivos y microorganismo

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico provistos por casas comerciales, el quitosano de mediano peso molecular fue adquirido de Hangzhou Simit Chemical Technology Co. Ltd (Hangzhou, China); el propóleo proviene de la cuenca del Río Duero (Burgos); las nanopartículas de plata de 60 nm fueron adquiridas de Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid); y El aislado de *Trametes versicolor* (20804) fue suministrado por la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia).

2.2 Preparación de los productos

Los oligómeros de quitosano (Q) se prepararon por hidrólisis ácida en una disolución de ácido acético (2%) añadiendo 0,3 M de H_2O_2 [8], obtenido una concentración de 20 mg/mL. El propóleo (P) se preparó como se describe en [9], posteriormente el extracto se diluyó en una solución hidroalcohólica 7:3. Las nanopartículas de plata (nAg) se diluyeron en agua desionizada, con una ligera agitación. Las disoluciones binarias y ternarias se prepararon en agua destilada autoclavada, mezclando los productos individuales en las cantidades necesarias para alcanzar la concentración final indicada en la tabla 1.

Tabla 1. Concentración de los productos aplicada en cada tratamiento

Solución	Tratamientos				
	1	2	3	4	5
Q	0,1	0,5	1,0	2,0	5,0
P	0,1	0,2	0,5	1,0	1,5
nAg	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
QP	0,5	1,0	2,0	-	-
QnAg	0,5	1,0	2,0	-	-
PnAg	0,5	1,0	2,0	-	-
QPnAg	0,5	1,0	2,0	-	-

Nota: las unidades expresadas para Q son en mg/mL, para P en 10^{-1} mg/mL y para nAg en µg/mL.

2.3 Ensayo in vitro 1: concentración mínima inhibitoria

La actividad antifúngica se evaluó añadiendo los productos en las diferentes concentraciones -en una proporción de 1:9- sobre PDA una vez esterilizado a 121 °C por 15 min y enfriado a 50 °C. Después de solidificar se depositó un disco de micelio de 5 mm en el centro de la placa, se prepararon 3 réplicas y se dejaron crecer en oscuridad a 27 °C durante 8 días, midiendo el crecimiento del micelio (cm) cada 24 horas.

2.4 Ensayo in vitro 2: efecto del recubrimiento de QPnAg

La concentración de cada producto individual que causó el 100% de inhibición del micelio en el ensayo anterior, se seleccionó para formar una mezcla triple. Con la mezcla de QPnAg (5.0 mg/mL, 0.5 mg/mL y 3.0 µg/mL, respectivamente) se recubrió la superficie de trozos de madera de *Populus* spp. de 30x15x2 mm, secados y esterilizados a 103+-2 °C; sumergiendo los trozos durante 30 min en la solución. Se dejaron secar a 50 °C y posteriormente se introdujeron a placas Petri cubiertas de T. versicolor crecido previamente sobre PDA. Se incubaron a 27 °C y se tomó una muestra de 8 repeticiones cada 7 días para dar seguimiento a la degradación.

3. Resultados y discusión

3.1 Concentración mínima inhibitoria

Las medidas de concentración obtenidas para evaluar el efecto fungicida de los compuestos individuales (oligómeros de quitosano, extracto de propóleo y nanopartículas de plata) mostraron evidentes daños sobre el micelio de *T. versicolor*, puesto que en todos los casos se observó una significativa reducción en la velocidad del crecimiento respecto al tratamiento control.

En el caso particular de los oligómeros de quitosano (Q), se observó una reducción del crecimiento incluso a concentraciones muy bajas (0,1 mg/mL), como se puede apreciar en la Figura 1. Al aumentar la concentración, el desarrollo del micelio se redujo, con un porcentaje mínimo de inhibición del crecimiento de 32,3% y alcanzando una supresión total del 100 % en la solución más concentrada (5 mg/mL), frente al tratamiento control.

La presencia de extractos de propóleo (P) también resultó exitosa a fin de inhibir el crecimiento del hongo. En la Figura 1 se aprecia directamente el efecto de inhibición del propóleo respecto a la evolución del micelio en el control, desde la muestra más diluida (0,1 mg/mL) que registra un 84% de inhibición del crecimiento, hasta la más concentrada (1 mg/mL) con un 100%. De hecho, para una concentración de 0,5 mg/mL de propóleo en el medio ya no se presentó crecimiento alguno al séptimo día de incubación. En el caso de las nanopartículas de plata, donde se emplearon concentraciones 10^{-3} y 10^{-6} veces menores en que en los ensayos con propóleo y quitosano respectivamente, entre 0,5 y 2,5 µg/mL, se obtuvieron resultados igualmente favorables. El mayor porcentaje de inhibición correspondió a un 96,4%, pero incluso en la prueba más diluida se logró un 63,5%, lo cual es indicativo de la alta capacidad antifúngica de la nanoplata, como se aprecia en la Figura 1.

Los resultados obtenidos de los ensayos de concentración óptima sirvieron para determinar ensayos de sinergia en la formulación de los compuestos binarios y ternarios. De acuerdo a los valores de la gráfica, se observa que la máxima inhibición al crecimiento se alcanza con el compuesto ternario de QPnAg (77%), superior en 13% al siguiente mejor: QnAg, que es de un 64%. Conforme a lo esperado, el conjunto de los tres elementos fungicidas mejoró la actividad contra los hongos, evidenciando la sinergia de la mezcla.

Los datos registrados mostraron un comportamiento más homogéneo a esta concentración, la diferencia entre el mayor índice de inhibición (88,5% del QP) y el menor (78,2% del Q) fue ligeramente menos pronunciada que a menor concentración de los productos. Se estima que al haber una mayor presencia de los principios activos, cada uno ejerció su efecto contra el desarrollo del micelio impidiendo el crecimiento de forma efectiva. Mientras que el Q, P y nAg inhibieron el crecimiento en un 94,9%, 88,5% y 93,6%, respectivamente, los mezclas binarias de QP, QnAg, PnAg y la ternaria de QPnAg, impidieron completamente la germinación de micelio (100%).

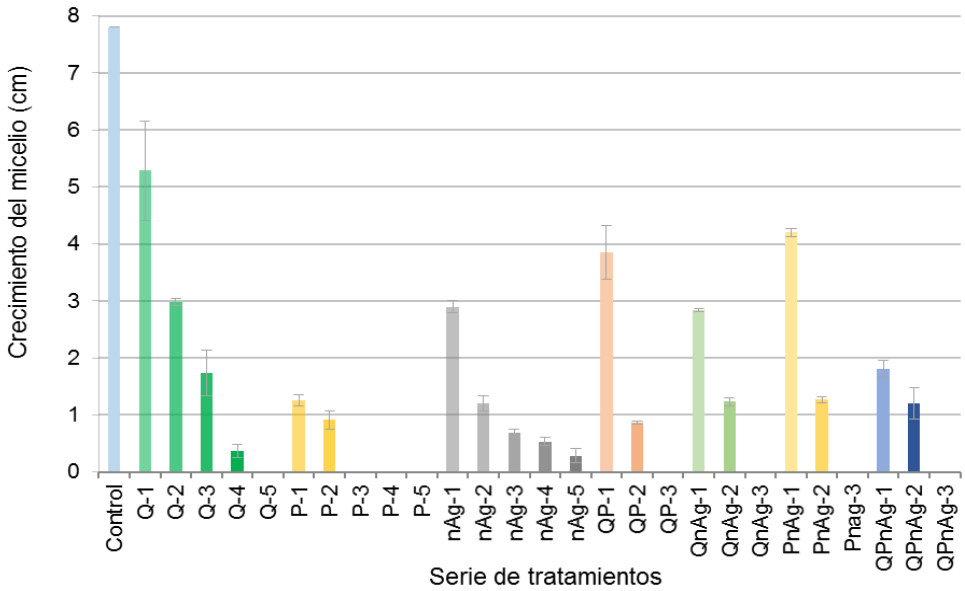

Figura 1. Resultados del tratamiento in vitro 1: concentración mínima inhibitoria

3.2 Efecto del recubrimiento de QPnAg

La composición inicial de la madera de *Populus* spp. se ha caracterizado a través de su espectro infrarrojo por FTIR. Los picos de absorbancia más representativos de la madera natural (sin haber sido expuesta al ataque del hongo) se han marcado en la Figura 2, donde encontramos una amplia vibración entre 3500 y 3300 cm-1 debidas a la vibración del enlace OH relativa al agua absorbida por la madera. Hacia la derecha aparece un pico en 2891 cm-1 debida a la vibración de estiramiento del enlace C-H. Siguiendo hasta la zona de la huella dactilar (1800 a 600 cm-1), se observan diversos

picos de absorción bien definidos, la vibración en 1735 cm-1 correspondería a un enlace de estiramiento no conjugado del C=O en el grupo xilano, un enlace de estiramiento conjugado C-O aparece en 1592 cm-1 y una vibración de anillos aromáticos se observa a 1504 cm-1. Las vibraciones de enlaces de C-H por deformación aparecen a 1456 y 1421 cm-1 correspondientes a moléculas de lignina y carbohidratos; a 1369 cm-1 debidas a la celulosa y hemicelulosa; y a 1324 cm-1 vibraciones C-H de la celulosa y C_1-O de derivados de siringil. Un pico más amplio se observa a 1232 cm-1 correspondiente a vibraciones del anillo de siringil y estiramientos del C-O de lignina y xilanos. A 1156 cm-1 se asigna la vibración C-O-C y a 1127 cm-1 -con un pico muy alto- el estiramiento de C-O de la celulosa y hemicelulosa. Finalmente se aprecia una ligera absorción en 897 cm-1 debida a un enlace de deformación del C-H de la celulosa [10].

En esta fase del estudio, se ha encontrado que en la primera semana de la exposición al hongo *T. versicolor*, la madera recubierta como la madera control han sufrido un nulo ataque del hongo, por lo tanto el espectro IR de la muestra a los 7 días de exposición resulta idéntica a la muestra inicial (Figura 2).

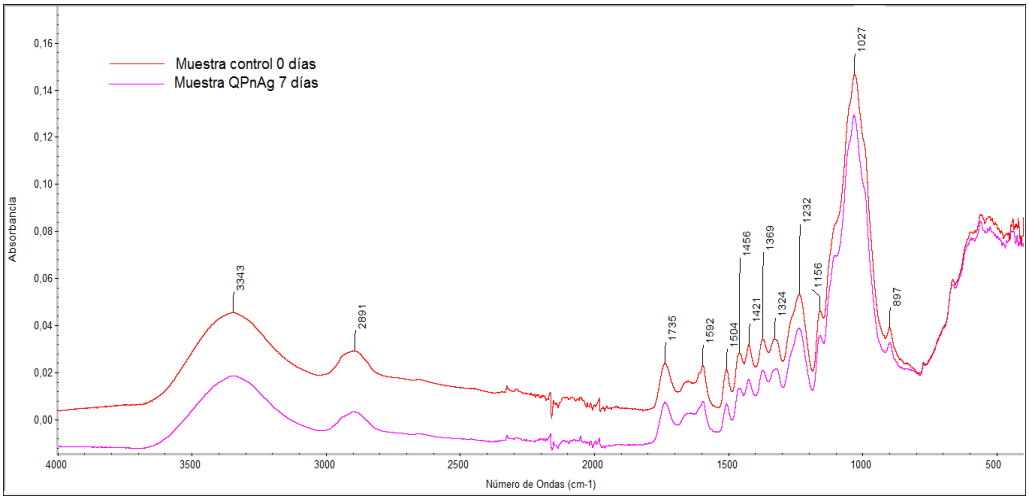

Figura 2. Resultados del tratamiento in vitro 2: efecto del recubrimiento de QPnAg

4. Conclusiones

La evaluación de la actividad antifúngica de los oligómeros de quitosano (Q), propóleo (P) y nanoplata (nAg) demuestra una alta capacidad fungicida sobre el crecimiento del micelio de *T. versicolor*, a muy bajas concentraciones de los productos individuales y en mezclas, al alcanzar un 100% de inhibición con 5,0 mg/mL de Q, 0,5 mg/mL de P y 3 µg/mL de nAg, aplicados individualmente; y también un 100% de inhibición con 2,0 mg/mL, 0,2 mg/mL y 2,0 µg/mL de QPnAg, respectivamente, en la combinación triple. La capacidad de inhibición o protección ante la pudrición blanca en la madera continúa en evaluación, sin embargo, de acuerdo a los datos preliminares se prevé un exitoso tratamiento antifúngico.

Agradecimientos

I. Silva Castro agradece especialmente a la Fundación CONAMA por la beca de participación en el congreso y al CONACYT-México por la financiación de los estudios doctorales.

Referencias

[1] Christopher J. Luley, “Identificación del tipo de pudrición de la madera y hongos xilófagos en árboles urbanos,” in *Wood Decay Fungi Common to Urban Trees in Northeast and Central United States*, 2006, p. 58.

[2] K. K. Pandey and A. J. Pitman, “FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 52, no. 3, pp. 151–160, 2003.

[3] S. A. U. Propamsa, “Propam Refractario Sección 1 : Identificación De La Sustancia O La Mezcla Y De La Sociedad O Empresa Sección 2 : Identificación De Los Peligros Sección 3 : Composición / Información Sobre Los Componentes Sección 4 : Primeros Auxilios Propam Refractario Se,” vol. 2006, no. 1907, pp. 1–7, 2013.

[4] P. M. Matei, P. Martín-Ramos, M. Sánchez-Báscones, S. Hernández-Navarro, A. Correa-Guimaraes, L. M. Navas-Gracia, C. A. Rufino, M. C. Ramos-Sánchez, and J. Martín-Gil, “Synthesis of Chitosan Oligomers / Propolis / Silver Nanoparticles Composite Systems and Study of Their Activity against Diplodia seriata,” *Int. J. Polym. Sci.*, vol. 2015, pp. 1–11, 2015.

[5] K. Ziani, I. Fernández-Pan, M. Royo, and J. I. Maté, “Antifungal activity of films and solutions based on chitosan against typical seed fungi,” *Food Hydrocoll.*, vol. 23, no. 8, pp. 2309–2314, 2009.

[6] R. Avila-Sosa, E. Palou, M. T. Jiménez Munguía, G. V. Nevárez-Moorillón, A. R. Navarro Cruz, and A. López-Malo, “Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 153, no. 1–2, pp. 66–72, 2012.

[7] W. Xia, P. Liu, J. Zhang, and J. Chen, “Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides,” *Food Hydrocoll.*, vol. 25, no. 2, pp. 170–179, 2011.

[8] T. Sun, D. Zhou, J. Xie, and F. Mao, “Preparation of chitosan oligomers and their antioxidant activity,” *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 225, no. 3–4, pp. 451–456, 2007.

[9] E. Torlak and D. Sert, “Antibacterial effectiveness of chitosan-propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 60, pp. 52–55, 2013.

[10] B. Mohebby, “Attenuated total reflection infrared spectroscopy of white-rot decayed beech wood,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 55, no. 4, pp. 247–251, 2005.