



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Máster en Ingeniería de Montes

Síntesis de nanopartículas de cobre y oligómeros de quitosano y estudio *in vitro* de su acción fungicida frente a *Trametes versicolor* aislado y en madera de *Populus* sp.

Alumno: Pablo Laiz Alonso

Tutor: Jesús Martín Gil
Cotutores: Milagros Casado Sanz
Agustín León Alonso-Cortés

Junio de 2017

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. ANTECEDENTES	4
2.1. <i>Trametes versicolor</i> (L.) Lloyd y la pudrición blanca de la madera	4
2.2. Nanopartículas de cobre	5
2.2.1. Propiedades, métodos de síntesis y principales aplicaciones	5
2.2.2. Mecanismos de su actividad antimicrobiana	6
2.2.3. Protección de madera frente a hongos de pudrición mediante nanopartículas metálicas.....	8
2.3. Quitosano	9
2.3.1. Propiedades y principales aplicaciones	9
2.3.2. Mecanismos de su actividad antimicrobiana y factores de los que depende	11
3. OBJETIVOS	15
4. MATERIAL Y MÉTODOS	17
4.1. Sustancias químicas, equipos y hongo	17
4.2. Síntesis de los compuestos individuales y binarios	17
4.2.1. Síntesis de las nanopartículas de óxido de cobre (I).....	17
4.2.2. Síntesis de los oligómeros de quitosano.....	18
4.2.3. Preparación de las dispersiones de CuNPs	19
4.2.4. Preparación de las disoluciones de oligómeros de quitosano	19
4.2.5. Preparación de las mezclas binarias	20
4.3. Caracterización de los compuestos	21
4.4. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antifúngica frente a <i>Trametes versicolor</i>	21
4.4.1. Primer ensayo: evaluación mediante el método de dilución en agar	21
4.4.1.1. Tratamiento estadístico de los datos obtenidos	24
4.4.2. Segundo ensayo: evaluación en madera de <i>Populus sp.</i> impregnada con los compuestos.....	26
4.4.2.1. Tratamiento estadístico de los datos obtenidos	28

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
5.1. Caracterización de los compuestos	30
5.1.1. Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)	30
5.1.2. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier y reflexión total atenuada (ATR-FTIR)	32
5.1.3. Difracción de rayos X de polvo cristalino (XRPD)	33
5.1.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	35
5.2. Actividad antifúngica frente a <i>Trametes versicolor</i>	36
5.2.1. Método de dilución en agar.....	36
5.2.1.1. Estadística descriptiva, curvas de crecimiento y actividad antifúngica	36
5.2.1.2. Estadística comparativa: clasificación en grupos homogéneos y estudio de la sinergia	42
5.2.1.3. Evaluación cualitativa	51
5.2.1.4. Discusión de los resultados obtenidos.....	52
5.2.2. Evaluación en madera de <i>Populus sp.</i> impregnada con los compuestos.....	54
5.2.2.1. Estadística descriptiva	54
5.2.2.2. Estadística comparativa: clasificación en grupos homogéneos.....	56
5.2.2.3. Evaluación cualitativa	61
5.2.2.4. Discusión de los resultados obtenidos.....	64
6. CONCLUSIONES	67
7. AGRADECIMIENTOS	70
8. BIBLIOGRAFÍA	72

1. Resumen

1. RESUMEN

En el presente estudio se aborda la síntesis de nanopartículas de cobre, oligómeros de quitosano y mezclas binarias de ambos compuestos con el objetivo de evaluar su capacidad antifúngica frente al hongo de pudrición blanca de la madera *Trametes versicolor*.

Los compuestos fueron caracterizados mediante técnicas de espectroscopía UV-Vis y ATR-FTIR, difracción de rayos X y microscopía SEM. De esta caracterización se evidenció la correcta síntesis de todos ellos y se puso de manifiesto la naturaleza de las nanopartículas sintetizadas, que se corresponden con nanopartículas de óxido de cobre (I) (Cu_2O).

La evaluación de la actividad antifúngica de los compuestos se llevó a cabo mediante dos ensayos *in vitro*. En el primero de ellos se utilizó el método de dilución en agar con el objetivo de determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de cada compuesto, estudiar su posible efecto sinérgico y obtener las curvas de crecimiento del hongo. El principal resultado de este ensayo fue la obtención de al menos una concentración por cada compuesto que inhibe totalmente el crecimiento del hongo, demostrándose de este modo su actividad antifúngica frente a *Trametes versicolor*.

El segundo ensayo *in vitro* consistió en la impregnación por inmersión de probetas de madera de *Populus sp.* con los compuestos previamente sintetizados, su posterior exposición a *T. versicolor* y la evaluación de la capacidad antifúngica mediante la medición de la pérdida de peso asociada al desarrollo del hongo, además de su observación directa mediante la realización de micrografías de cortes transversales de las probetas. Con este ensayo se puso de manifiesto la alta efectividad de las CuNPs sintetizadas para proteger la madera de *Populus sp.* frente al ataque de *T. versicolor*.

Los resultados obtenidos suponen un apoyo a la labor de búsqueda de nuevos compuestos protectores de la madera más respetuosos con el medio ambiente, efectivos e innovadores. Se anima por lo tanto a la continuación de esta línea de investigación en futuros estudios.

2. Antecedentes

2. ANTECEDENTES

2.1. *Trametes versicolor* (L.) Lloyd y la pudrición blanca de la madera

El hongo utilizado en el presente estudio para probar la eficacia de los compuestos sintetizados es *Trametes versicolor*, un basidiomiceto perteneciente al orden de los Polyporales y a la familia Polyporaceae. Como características morfológicas principales destacan sus muy delgadas hifas (del orden de 0,5-4 μm) y sus característicos cuerpos fructíferos en forma de abanico, duros, con bandas concéntricas de multitud de colores en su parte superior aterciopelada y con poros de cierta longitud en su parte inferior blanco crema.

Es causante de pudrición blanca de la albura en casi todas las especies de frondosas y en algunas de coníferas. Debido a sus delgadas hifas, éstas pueden pasar sin problemas por las punteaduras de vasos y traqueidas, propagándose así a través de la madera y degradándola mediante la secreción de enzimas como la oxidasa, la fosfatasa y la mutasa; produciendo las dos últimas fermentaciones alcohólicas cuando actúan en medios anaeróbicos.

La pudrición blanca se caracteriza por el ataque del hongo tanto a la celulosa y a la hemicelulosa como a la lignina, si bien es a esta última a la que más afecta, tanto en rapidez como en intensidad. Las enzimas arriba enumeradas son segregadas en los lúmenes celulares, produciendo la degradación química de los componentes de la pared celular desde su parte externa en contacto con el lumen hasta la laminilla media.

El proceso de degradación de la lignina se basa en su mineralización enzimática mediante tres acciones principales: la rotura de las cadenas laterales del polímero originando grupos carboxílicos, la rotura de las cadenas terminales produciendo residuos ácido-aromáticos y la rotura de los anillos aromáticos. En cuanto a las celulosas y hemicelulosas el hongo origina la ruptura de sus moléculas, produciéndose con posterioridad la oxidación de los azúcares así formados.

La madera resultante de todo este proceso de degradación se caracteriza por la desaparición de la lignina (proceso de deslignificación), lo que origina huecos y alveolos que son rellenados o cubiertos con restos de celulosa más o menos afectados por el hongo, los cuales son la causa del color blanquecino característico de este tipo de pudrición. El material final no presenta ninguna actividad resistente, si bien conserva en cierto grado su forma y estructura. No obstante, el aspecto de la madera puede ser de alternancia entre zonas sanas no decoloradas y zonas de vetas blancas originadas por la acción del hongo Figura 1.

La información relativa a este apartado ha sido extraída de Rodríguez Barreal (1998).



Figura 1. Madera de *Pinus sp.* infectada por *Trametes versicolor*, presentando las típicas vetas blancas características de la pudrición blanca.

2.2. Nanopartículas de cobre

2.2.1. Propiedades, métodos de síntesis y principales aplicaciones

Por convención, se definen las nanopartículas (NPs) como todas aquellas partículas cuyo diámetro se sitúa entre 1 y 100 nm y se encuentran en dispersión, ya sea en un medio gaseoso, líquido o sólido (Capaldi Arruda, Diniz Silva, Moretto Galazzi, Antunes Azevedo, & Zezzi Arruda, 2015).

En los últimos años, la investigación en el campo de las NPs, especialmente las metálicas, y su aplicación en el desarrollo de nuevos productos comerciales y aplicaciones industriales se ha incrementado drásticamente. Sus propiedades eléctricas, ópticas, fisicoquímicas o antimicrobianas únicas son las razones de que grandes áreas de la ciencia como la física, la química, la biología o la medicina se hayan centrado en ellas.

A día de hoy, las nanopartículas de cobre y de plata ya se utilizan en diversas formulaciones y productos con características antimicrobianas, tales como tejidos sintéticos, dispositivos biomédicos, instrumentos quirúrgicos, procesado y empaquetado de comida o purificación de agua (Giannossa et al., 2013; Ingle, Duran, & Rai, 2014; Theron, Walker, & Cloete, 2008).

En cuanto a las nanopartículas de cobre (CuNPs) en particular, éstas pueden ser sintetizadas mediante múltiples métodos, siendo algunos de ellos la reducción química (Dong, Cai, Zhang, & Cao, 2014; Granata, Yamaoka, Pagnanelli, & Fuwa, 2016; Sierra-Ávila et al., 2015; Zhang & Yang, 2013), sonoquímica (Kumar, Mastai, Diamant, & Gedanken, 2001), térmica (Dhas, Raj, & Gedanken, 1998) o biológica (Harne et al., 2012; Hasan et al., 2008; Lee et al., 2011; Varshney, Bhadauria, Gaur, & Pasricha, 2010), la irradiación de microondas (Blosi, Albonetti, Dondi, Martelli, & Baldi, 2011), la radiólisis mediante rayos gamma (Ali, Ghazy, Meligi, Saleh, & Bekhit, 2016), la deposición de vapor de cobre en vacío (Z. Liu & Bando, 2003), la ablación láser (Schaumberg, Wollgarten, & Rademann, 2014) o las técnicas con fluidos supercríticos (Ziegler, Doty, Johnston, & Korgel, 2001).

Una de las ventajas que presentan las CuNPs frente a otro tipo de nanopartículas metálicas es que tienen la capacidad de oxidarse y formar nanopartículas de óxido de cobre (CuO y Cu₂O), muy estables en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas y con la capacidad de combinarse con otras macromoléculas y polímeros, como es precisamente el quitosano (Ingle et al., 2014; Usman, Ibrahim, Shameli, Zainuddin, & Yunus, 2012).

2.2.2. Mecanismos de su actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de las NPs metálicas se debe, en gran medida, a su pequeño tamaño y a su elevada relación superficie-volumen, características que las hacen incrementar su interacción con los microorganismos generando múltiples y variados efectos sobre ellos (Ingle et al., 2014). No obstante, los mecanismos exactos que rigen esta actividad antimicrobiana no son a día de hoy del todo conocidos, si bien varias investigaciones han sugerido diversas vías, anticipando que los modos de acción tanto de las nanopartículas metálicas como de las oxidadas son similares (Ruparelia, Chatterjee, Duttagupta, & Mukherji, 2008).

En cuanto a su acción bactericida, una de estas vías consiste en la ruptura de la pared y la membrana celulares provocada, en parte, por la afinidad de las CuNPs por los grupos amino y carboxilo presentes en sus superficies. Esto hace aumentar la permeabilidad de la célula, permitiendo la fuga del contenido celular (que por sí misma puede explicar su muerte) y la entrada de las CuNPs en su interior (Goalakrishnan, Ramesh, Ragunathan, & Thamiselvan, 2012; Ruparelia et al., 2008). Una vez que se encuentran en el interior de la bacteria, las CuNPs pueden unirse con las moléculas de ADN y alterar su estructura helicoidal, provocando reacciones de reticulación tanto en el interior de las hebras como entre dos o más de ellas (Ingle et al., 2014).

Otra de las vías propuestas para explicar la acción antibacteriana de las CuNPs consiste en la desactivación de las enzimas causada por las interacciones entre sus grupos -SH y las nanopartículas, produciéndose además peróxido de hidrógeno como producto, causante de la muerte celular (Das, Gang, Nath, & Bhattacharjee, 2010, citado en Ingle et al., 2014; Schrand et al., 2010). Además, las CuNPs liberan iones Cu²⁺ y Cu⁺ en el interior de la célula, que también tienen efectos en la disrupción de ciertos procesos bioquímicos (Ingle et al., 2014; Stohs & Bagchi, 1995).

En el caso de las células eucariotas, Chang, Zhang, Xia, Zhang, & Xing (2012) proponen tres mecanismos diferentes para explicar los efectos tóxicos de las CuNPs y otras nanopartículas metálicas en estado de oxidación (Figura 2). Éstos son el estrés oxidativo, las interacciones de coordinación y la disrupción de la homeostasis. Reportan que la entrada de las NPs en el interior de la célula puede producirse por tres vías distintas: a través de los poros de la membrana celular, si son lo suficientemente pequeñas; por los canales iónicos de las proteínas de transporte; o por endocitosis (la envoltura de las NPs por la membrana celular y su acceso al citoplasma en el interior de una vesícula llamada endosoma).

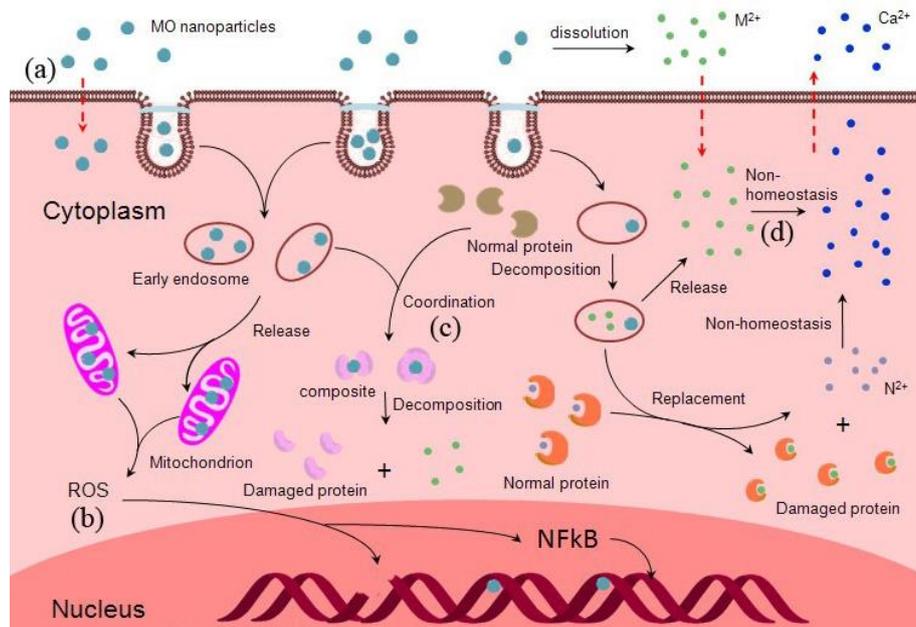


Figura 2. Esquema de las diferentes vías de inducción de toxicidad celular por parte de NPs metálicas oxidadas (MO). ROS: Reactive oxygen species. Fuente: (Chang et al., 2012).

El estrés oxidativo se produce como consecuencia de la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO: O^{2-} , OH^- y H_2O_2) inducida por las NPs en el interior de la célula. Las ERO pueden producirse por la interacción de las nanopartículas con orgánulos oxidativos como las mitocondrias, o por reacciones químicas entre la capa de electrones externa de las NPs y diversas biomoléculas, resultando en este caso en la generación de aniones superóxido (O^{2-}). El estrés oxidativo intracelular así producido altera el balance entre los procesos oxidantes y antioxidantes de la célula, pudiendo provocar daños en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, así como mutaciones o rupturas en las cadenas de ADN, lo que fácilmente puede desembocar en la muerte celular.

En cuanto a las interacciones de coordinación, los iones positivos generados por las NPs (Cu^{2+} o Cu^+ en el caso de las CuNPs) pueden interactuar con una gran cantidad de proteínas, sustituyendo a los cationes que forman parte de su estructura interna y formando así complejos que la desestructuran y pueden llegar a inhabilitarla por completo. También el ADN puede verse afectado por este proceso, pues complejos formados con otras biomoléculas pueden atravesar la membrana nuclear e interactuar con él o con sus proteínas asociadas, además de dificultar los procesos de transcripción y traducción mediante la interacción con el ARN.

El último mecanismo propuesto por Chang et al. (2012) es la suspensión de la homeostasis intracelular a consecuencia de los cationes liberados por las NPs. Al aumentar la concentración de éstos, los mecanismos homeostáticos se ven alterados, pudiendo llegar a niveles de toxicidad y muerte celular. Además, las NPs pueden afectar a la homeostasis de manera indirecta, pues el estrés oxidativo provocado por

ellas estimula la entrada de iones Ca^{2+} en el interior de la célula, alterando de esta forma el equilibrio catiónico y pudiendo provocar su muerte.

2.2.3. Protección de madera frente a hongos de pudrición mediante nanopartículas metálicas

Existen varios antecedentes en el uso de nanopartículas metálicas para la protección de madera frente a hongos de pudrición. Uno es el estudio de Kartal, Green, & Clausen (2009), quienes evaluaron la eficacia tanto de nanopartículas de cobre como de zinc en la protección de madera de *Pinus sp.* frente a hongos de pudrición parda (*Antrodia sp.* y *Gloeophyllum trabeum*) y de *Liquidambar sp.* frente a *Trametes versicolor* (pudrición blanca). Los resultados obtenidos indican un significativo grado de protección frente a *T. versicolor* y *G. trabeum* por parte de las CuNPs (pérdidas de masa por debajo del 10 %, siendo del 30 % la del control), aunque no así frente a *Antrodia sp.* Comparativamente, las ZnNPs se mostraron menos efectivas en todos los casos, sobre todo frente a *G. trabeum*.

Akhtari & Arefkhani (2013) han probado la eficacia en la protección de madera de *Paulownia fortunei* frente a *T. versicolor* por parte de suspensiones a 400 ppm de nanopartículas de Ag, Cu y Zn oxidado. Los resultados reflejan pérdidas de masa de entre el 2 % y el 2,5 % en los tres casos, tras 16 semanas de exposición al hongo, frente al 28 % del tratamiento control. Además, realizaron microfotografías SEM en las que pueden apreciarse las diferencias evidentes entre la madera sin tratar y la tratada. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Rezaei, Usefi, & Soltani (2011), cuyas probetas de madera de *Populus deltoides* experimentaron, frente a *T. versicolor*, pérdidas de masa del 36,1 % y del 29 % tras ser tratadas con dispersiones de nanopartículas de plata a 200 ppm y 400 ppm respectivamente, mientras que la del tratamiento control fue del 41,82 %.

También Paril et al. (2017) han evaluado recientemente el efecto que las nanopartículas de Cu y Ag ejercen en la pérdida de masa de madera de *Fagus sylvatica* frente a *T. versicolor* (pudrición blanca) y de *Pinus sylvestris* frente a *Poria placenta* (pudrición parda). Tras ser tratadas con dispersiones de nanopartículas de 1 y 3 g/l y expuestas durante 16 semanas al hongo, los resultados reflejan una gran eficacia tanto de las CuNPs como de las AgNPs a la hora de proteger la madera de *F. sylvatica* frente a *T. versicolor* (pérdidas de masa menores del 2 %). En el caso de *P. placenta* los resultados fueron más dispares, si bien las CuNPs produjeron pérdidas de masa menores del 5 %, mientras que las AgNPs se situaron entre el 5 % y el 15 %.

Shah et al. (2010) han demostrado la disminución en la producción de enzimas de degradación de la lignocelulosa por parte de *Trametes versicolor* cuando es tratado con nanopartículas de cobre y de hierro. Cabe pensar que este efecto podría estar en relación con la reducción de la pérdida de masa reportada por las investigaciones anteriormente citadas, si bien es probable que existan más causas que intervienen en el proceso, las cuales se encuentran aún pendientes de investigar.

2.3. Quitosano

2.3.1. Propiedades y principales aplicaciones

El quitosano es un aminopolisacárido lineal derivado de la quitina, el segundo polímero natural más abundante después de la celulosa, compuesto que se halla formando parte del exoesqueleto de la mayoría de los artrópodos (arácnidos, crustáceos e insectos), así como de la pared celular de ciertos hongos y algas. En comparación, el quitosano es mucho menos abundante en la naturaleza que la quitina, habiendo sido encontrado únicamente formando parte de las paredes celulares de ciertos hongos (Muzzarelli, 1986, citado en Badawy & Rabea, 2011).

La quitina está formada por la unión mediante enlaces β -1,4 de múltiples monómeros de N-acetilglucosamina, un derivado de la glucosa en el que el grupo hidroxilo (-OH) del segundo carbono ha sido sustituido por un grupo amino (-NH₂) que a su vez ha experimentado una acetilización incorporando un grupo acetilo (-CO-CH₃) en sustitución de uno de los hidrógenos.

El quitosano, por su parte, es sintetizado a partir de la desacetilización alcalina total o parcial de la quitina, eliminándose el grupo acetilo de los monómeros de N-acetilglucosamina, quedando ésta transformada en glucosamina. Por lo tanto, se trata de un polímero formado por monómeros tanto de N-acetilglucosamina como de glucosamina en proporción variable (Figura 3), siendo ésta medida por el grado de desacetilización, que puede oscilar entre el 70 % y el 100 % (Badawy & Rabea, 2011).

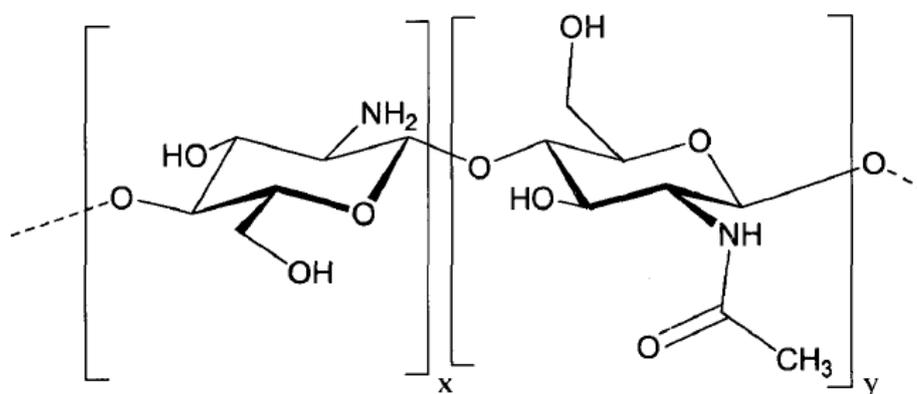


Figura 3. Estructura química del quitosano; x: glucosamina, y: N-acetilglucosamina. Fuente: (Concha Murray et al., 2013)

Una de las características químicas más interesantes del quitosano, derivadas de este proceso, es su capacidad de ser disuelto en medio ácido; propiedad debida a la ligera carga positiva presentada por el grupo amino generado. Esto lo diferencia del resto de polisacáridos existentes, cuya carga es generalmente neutra o negativa. No obstante, esta característica también puede ser un inconveniente, puesto que es insoluble en medios con un pH superior a 6,5 (Badawy & Rabea, 2011).

Otras de las características especiales que hacen que este polímero tenga multitud de aplicaciones son el hecho de tener una estructura química definida, poder ser modificado química y enzimáticamente, ser funcional física y biológicamente, ser biodegradable y biocompatible con multitud de órganos, tejidos y células y poder ser procesado en diversos formatos como copos, polvo, perlas, membranas, esponjas, algodones, fibras y geles (Badawy & Rabea, 2011).

Entre estas aplicaciones destaca de manera especial su amplio uso como agente antimicrobiano, especialmente en el campo de la fitopatología (agrícola y forestal) debido a sus características de no toxicidad y biodegradabilidad, que lo hacen medioambientalmente respetuoso y sin efectos perjudiciales para la salud, característica que también explica su utilización en el saneamiento de aguas (Badawy & Rabea, 2011; Chen, Chen, Bai, & Li, 2013; Zeng, Wu, & Kennedy, 2008).

Al carecer de propiedades antigénicas (Badawy & Rabea, 2011) ha sido extensamente empleado desde los años 1960 en el campo de la dietética y la medicina. Como suplemento dietético se utiliza desde hace 25 años para favorecer la pérdida de peso (Badawy y Rabea, 2011). En medicina, algunos de los usos en los que se emplea o se espera hacerlo son el de agente hemostático, regenerador de tejidos, compuesto cicatrizante, tratamiento de quemaduras, aplicaciones oftalmológicas (lentes de contacto) o fabricación de cápsulas para medicamentos con propiedades dosificadoras (Dutta, Dutta, & Tripathi, 2004).

Destaca su empleo como desinfectante comercial por su gran actividad y espectro, siendo utilizado mayormente contra levaduras y mohos, y en menor medida como antibacteriano frente a bacterias gram-positivas y gram-negativas (Kendra & Hadwiger, 1984, citado en Badawy & Rabea, 2011).

También ha sido reportada su actividad antivírica frente a algunos virus de plantas y otros organismos, siendo un potencial protector de numerosos cultivos de gran importancia comercial frente a estos agentes (Chirkov, 2002; Iriti & Varoni, 2015). Igualmente es una sustancia prometedora como protector superficial de frutas y verduras tras su recolección, con el fin de evitar su rápido deterioro durante el almacenamiento y transporte (Park, Stan, Daeschel, & Zhao, 2005; Romanazzi, Nigro, Ippolito, DiVenere, & Salerno, 2002).

En cuanto a su uso como fungicida, el quitosano actúa en diversos estados de desarrollo del hongo: inhibiendo el crecimiento del micelio, la esporulación, la viabilidad de las esporas, la germinación de éstas o la producción de factores de virulencia (Badawy & Rabea, 2011). No obstante, muestra peores resultados frente a hongos que contienen quitina o quitosano como componente de sus paredes celulares (Allan & Hadwiger, 1979).

Ha demostrado buenos resultados protegiendo diversos cultivos (soja, maíz, arroz, trigo, cebada, mijo, girasol, vid, patata, alfalfa, cacahuete, guisante, pepino, zanahoria, tomate, colza, peral, cocotero, tabaco y otros) frente a numerosos hongos patógenos mediante su aplicación directa al suelo o a las raíces (Benhamou, Lafontaine, & Nicole, 1994; Boonlertnirun, Boonraung, & Suvanasara, 2008; El Hassni, El Hadrami, Daayf,

Barka, & El Hadrami, 2004), recubriendo las semillas antes de la germinación (Benhamou et al., 1994; Boonlertnirun et al., 2008; Reddy, Arul, Angers, & Couture, 1999) o rociando las hojas de la planta ya desarrollada (Boonlertnirun et al., 2008).

También en el ámbito forestal ha quedado demostrada su eficacia frente a hongos patógenos presentes habitualmente en viveros, como *Fusarium oxysporum* (Qin et al., 2012), *Macrophomina phaseolina*, *Alternaria alternata* o *Rhizoctonia solani* (Saharan et al., 2013).

2.3.2. Mecanismos de su actividad antimicrobiana y factores de los que depende

El mecanismo exacto de la actividad antimicrobiana del quitosano es todavía desconocido, aunque se han realizado numerosos estudios que apuntan a posibles modos de interacción entre las moléculas de este polisacárido y las células de los organismos. Se ha reportado que el quitosano (un polication), al unirse con los fosfolípidos o proteínas (cargados negativamente) de la membrana celular provoca cambios en su estructura y un aumento de su permeabilidad, a causa de la cual se produce una fuga de electrolitos y otras sustancias constituyentes intracelulares que acaban por producir la muerte celular al disminuir su capacidad de replicación (Young & Kauss, 1983).

Se sabe, además, que la inhibición del crecimiento de hongos patógenos en diversas plantas está relacionada con la capacidad del quitosano para inhibir la producción de aflatoxinas por éstos, así como para estimular la elaboración de diversas sustancias relevantes en el sistema defensivo de las plantas como fitoalexinas, compuestos fenólicos o quitinasas, entre otras (Badawy & Rabea, 2009; El Ghaouth, Arul Wilson, C., & Benhamou, 1997; Reddy, Angers, Castaigne, & Arul, 2000).

Otros mecanismos propuestos que explican la actividad antimicrobiana del quitosano son la posible unión de sus moléculas, cuando tienen un bajo peso molecular y son capaces de penetrar en el interior de las células, con el ADN del microorganismo, interfiriendo en la síntesis del ARNm y las proteínas y provocando por tanto la muerte celular (Hadwiger, Kendra, Fristensky, & Wagoner, 1986); la formación de una capa polimérica impermeable alrededor de la superficie celular que altera su permeabilidad e impide la entrada de nutrientes en el interior, con la consiguiente muerte de la misma (Badawy & Rabea, 2011) o la capacidad del quitosano para adsorber sustancias celulares cargadas negativamente y flocularlas, lo que interrumpe las actividades fisiológicas y provoca la muerte celular (Badawy & Rabea, 2011).

Además, el quitosano es el polímero natural que mayores propiedades quelantes presenta (Badawy y Rabea, 2011). Ello se debe principalmente a la acción de su grupo amino (dador de un par de electrones), y en menor medida al hidroxilo, ambos buenos ligandos a la hora de coordinarse con iones de metales de transición. De esta manera pueden formarse diversos complejos metal-quitosano, entre los cuales destacan los establecidos con Cu^{2+} (Figura 4), por el que muestra una especial querencia, así como los formados con Zn^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} o Ag^+ (Higazy, Hashem, ElShafei, Shaker, & Hady, 2010; Mekahlia & Bouzid, 2009; Rhazi et al., 2001; Vold, Vårum, Guibal, &

Smidsrød, 2003; Wang, Du, & Liu, 2004). Estos complejos, entre otros efectos, aumentan la carga positiva del compuesto, incrementando por lo tanto su actividad antimicrobiana al inhibir la producción de toxinas y el crecimiento del microorganismo (Badawy y Rabea, 2011).

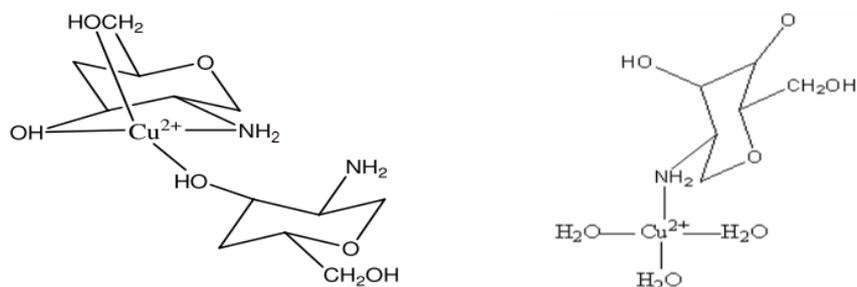


Figura 4. Diferentes estructuras de los complejos quitosano-Cu²⁺ según Mekahlia & Bouzid (2009).

La actividad antimicrobiana exhibida por el quitosano depende de múltiples factores, tanto intrínsecos como extrínsecos a él; entre ellos destacan el peso molecular (MW, “Molecular Weight”), el grado de desacetilización (DDA, “Degree of Deacetylation”), el pH, la temperatura, la solubilidad, la concentración, la densidad de cargas positivas, la modificación química experimentada, sus características hidrofílicas o hidrofóbicas, su capacidad quelante y el tipo de microorganismo evaluado (Badawy & Rabea, 2011).

En general, quitosanos de bajo peso molecular (menor de 10 kDa) presentan una mayor actividad antimicrobiana, si bien es necesario que su grado de polimerización (DP, “Degree of Polymerization”) sea al menos de 7, pues moléculas más pequeñas presentan muy baja o ninguna actividad (Uchida, Izume, & Ohtakara, 1989, citado en Badawy & Rabea, 2011). No obstante, este aspecto no está del todo claro, y varios estudios (Hwang, Kim, Yoon, & Pyun, 1998, citado en Badawy & Rabea, 2011; Jeon, Park, & Kim, 2001) concluyen que quitosanos de mayor MW fueron más efectivos en sus ensayos, si bien siempre existe un límite máximo a partir del cual la actividad antimicrobiana decrece.

En cuanto al grado de desacetilización, la actividad antimicrobiana del quitosano es directamente proporcional a éste, puesto que a mayor DDA, mayor número de grupos amino. En un medio ácido se forman más grupos amino protonados, lo que lo hace completamente soluble en agua y, a consecuencia, su probabilidad de interactuar con las paredes celulares de los microorganismos cargadas negativamente aumenta (Sekiguchi et al., 1994, citado en Badawy & Rabea, 2011).

El mismo motivo hace que a menores pH la actividad antimicrobiana del quitosano sea mayor (Tsai & Su, 1999), además del hecho de que el propio medio ácido inflige estrés en los microorganismos. Algunos estudios (Liu, Guan, Yang, Li, & Yao, 2000; Sudarshan, Hoover, & Knorr, 1992, citado en Badawy & Rabea, 2011) han reportado el hecho de que a pH 7 el quitosano no presenta ninguna actividad antimicrobiana debido a la desprotonación de los grupos amino y a su escasa solubilidad en agua.

En cuanto a la temperatura, ésta guarda una relación directamente proporcional con su actividad antimicrobiana, siendo más efectiva cuanto más elevada es, debido a que aumenta el grado de interacción entre las moléculas de quitosano y las del organismo (Tsai & Su, 1999).

3. Objetivos

3. OBJETIVOS

El objetivo principal del estudio es determinar la capacidad antifúngica de las nanopartículas de cobre, los oligómeros de quitosano y un compuesto resultante de la mezcla de ambos frente al hongo de pudrición blanca de la madera *Trametes versicolor*.

Como objetivos específicos en aras de la consecución del objetivo principal, se contemplan los siguientes:

- Sintetizar nanopartículas de cobre con unas características apropiadas para su empleo en la evaluación antifúngica *in vitro* por medio de un método de reducción química en condiciones controladas.
- Sintetizar oligómeros de quitosano de bajo peso molecular para su empleo en la evaluación antifúngica *in vitro*.
- Sintetizar un compuesto binario en base a las nanopartículas de cobre y los oligómeros de quitosano para evaluar su acción antifúngica *in vitro* y determinar si existe efecto sinérgico entre ambos compuestos.
- Caracterizar los compuestos obtenidos mediante técnicas de espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis), espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier y reflexión total atenuada (ATR-FTIR), difracción de rayos X de polvo cristalino (XRPD) y microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Obtener la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los compuestos sintetizados, así como las curvas de crecimiento del hongo *Trametes versicolor* tras su exposición a los mismos, mediante la realización de un primer ensayo *in vitro* siguiendo el método de dilución en agar.
- Valorar la eficacia antifúngica frente a *Trametes versicolor* de distintas concentraciones de nanopartículas de cobre y oligómeros de quitosano, tomados de forma aislada y como compuesto binario, en tratamientos de inmersión sobre madera de *Populus sp.* mediante la realización de un nuevo ensayo *in vitro*.

4. Material y métodos

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Sustancias químicas, equipos y hongo

Se emplearon las siguientes sustancias químicas: sulfato de cobre (II) pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) de grado reactivo analítico y ácido acético glacial (CH_3COOH) suministrados por Panreac (Castellar del Vallès, España); hidrazina monohidrato ($\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) con grado reactivo 98 % y polivinilpirrolidona (PVP) de peso molecular promedio 10000 suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); e hidróxido de sodio (NaOH) en escamas de Manuel Riesgo (Madrid, España).

El quitosano es de peso molecular medio y fue suministrado por Hangzhou Simit Chemical Technology (Hangzhou, China); mientras que el PDA (agar de patata dextrosada) utilizado como medio de cultivo es de Becton, Dickinson & Company (Franklin Lakes, NJ, USA).

Los reactivos se pesaron en una balanza Ohaus (Parsippany, NJ, USA) Adventurer con una legibilidad de 0,001 g, y las probetas de madera en una balanza Denver Instrument (Bohemia, NY, USA) AA-200 con legibilidad de 0,0001 g. Se empleó un desecador de cristal Simax (Praga, República Checa) para mantener las probetas en estado anhidro antes de ser pesadas. Para la aplicación de calor y agitación se utilizó un agitador magnético con calefacción Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) Cimarec, mientras que para la aplicación de ultrasonidos un sonicador modelo CSA 20-S500, con una frecuencia de trabajo de 20 kHz y una potencia máxima de 500 W. Las muestras para las micrografías se tomaron con un microtomo de deslizamiento Leica (Wetzlar, Alemania) SM 2000 R y fueron estudiadas con un microscopio Leica (Wetzlar, Alemania) DMLB 100T equipado con una videocámara a color JVC (Yokohama, Japón) TK-1280E.

Para la caracterización de los compuestos se emplearon un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) Multiskan GO, un espectrómetro FT-IR Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) Nicolet iS50 equipado con un sistema de reflexión total atenuada (ATR) mediante cristal de diamante, un difractómetro de rayos X Bruker (Billerica, MA, USA) D8 Advance Bragg-Brentano y un microscopio electrónico de barrido FEI (Hillsboro, OR, USA) Quanta 200 FEG.

Por último, el aislado de *Trametes versicolor* (cepa de referencia DSM 3086) fue suministrado por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Valencia.

4.2. Síntesis de los compuestos individuales y binarios

4.2.1. Síntesis de las nanopartículas de óxido de cobre (I)

Las nanopartículas de óxido de cobre (I), Cu_2O o cuprita (en adelante CuNPs), se obtuvieron por reducción química mediante la aplicación de un método de síntesis basado en Granata et al. (2016), si bien con ligeras modificaciones:

Se preparan como fuente de cobre 25 ml de una disolución de CuSO_4 0,2 M (pH 4,5), así como sendas disoluciones de N_2H_4 0,2 M (pH 10) (agente reductor) y NaOH 5 M (base).

A la disolución de sulfato de cobre (II) se adicionan bajo agitación 1,64 g de PVP (polivinilpirrolidona), que actúa como agente estabilizante/secuestrante de los iones Cu^{2+} . Seguidamente se añaden 0,15 ml de NaOH 5 M, a consecuencia de lo cual se observa un aumento de la turbidez, aunque sin que varíe el color azul claro inicial de la disolución (debido al $\text{Cu}^{2+}\cdot\text{H}_2\text{O}$).

Se aplica calor y agitación hasta que la disolución alcanza los 83 °C, momento en el que se vierten de una sola vez 25 ml de la disolución de hidracina. El color cambia rápidamente de azul claro (Cu^{2+}) a marrón anaranjado (Cu^+), pasando brevemente por el verde, y produciéndose un leve burbujeo durante escasos segundos. Asimismo la temperatura baja hasta los 60 °C y el pH se sitúa en torno a 9,5. El color marrón anaranjado indica la formación de nanopartículas de óxido de cobre (I) en estado de dispersión coloidal.

Se sigue aplicando calor y agitación durante 12 minutos hasta que se llega a los 85 °C, momento en el cual, tras no observarse ningún cambio visible en la dispersión, se deja enfriar lentamente y bajo agitación. A los 22 minutos desde que se vierte la hidracina la temperatura es de 67 °C, a los 30 min de 53 °C y a los 53 min de 32 °C.

Tras finalizar el enfriamiento, la dispersión resultante presenta un color marrón claro ligeramente anaranjado (Figura 5), con un precipitado marrón que se corresponde con Cu_2O o cuprita.

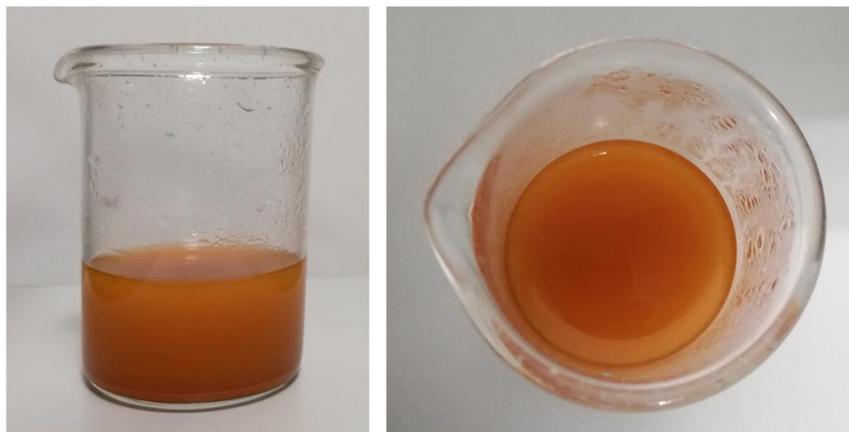


Figura 5. Dispersión final de CuNPs.

4.2.2. Síntesis de los oligómeros de quitosano

Siguiendo el método propuesto por Sun, Zhou, Xie y Mao (2007) se preparan 500 ml de una disolución de ácido acético al 2% a la que se añaden 10 g de quitosano de peso molecular medio (140000-300000 Da) para obtener una disolución 20 mg/ml.

Tras elevar la temperatura a 60°C se añade H₂O₂ al 30% para obtener una concentración 0,3 M en la disolución final. Ésta se mantiene bajo agitación y a temperatura constante (60°C) durante 12 horas hasta que todo el quitosano se ha disuelto y fragmentado. Tras ello, se sonica a 20000 Hz durante 6 periodos de 5 minutos cada uno.

La disolución de oligómeros de quitosano (QuiOli) obtenida tiene pH 5, y el peso molecular de estos se sitúa en torno a 2000 Da, lo que equivale a cadenas de entre 10 y 12 monómeros, de acuerdo con los resultados reportados por Sun et al. (2007).

4.2.3. Preparación de las dispersiones de CuNPs

Tras dejar precipitar las CuNPs en un recipiente cerrado y aislado se extrae la disolución sobrenadante con una pipeta y se prepara una suspensión acuosa de 5000 ppm con las CuNPs obtenidas. Dicha suspensión es sometida a sonicación durante 1 minuto a 20000 Hz para dispersarla y homogeneizarla.

A partir de esta dispersión inicial se obtienen 50 ml de cada una de las subsiguientes: 3000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm y 125 ppm, tal como aparecen en la Figura 6, mediante la disolución de los volúmenes requeridos en agua destilada y su posterior sonicación durante 1 minuto a 20000 Hz (Figura 7).



Figura 6. Dispersiones de CuNPs obtenidas: 5000 ppm, 3000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm y 125 ppm (de izquierda a derecha) y disolución sobrenadante.



Figura 7. Sonicación de las CuNPs.

4.2.4. Preparación de las disoluciones de oligómeros de quitosano

Se prepararon dos disoluciones de oligómeros de quitosano: 10 mg/ml y 5 mg/ml, a partir de la primigenia de 20 mg/ml, mediante la adición del correspondiente volumen de agua destilada (Figura 8). Una vez que ésta fue añadida, cada disolución se sonica durante 1 minuto a 20000 Hz para conseguir una perfecta homogeneización.



Figura 8. Disoluciones de QuiOli obtenidas: 20 mg/ml, 10 mg/ml y 5 mg/ml (de izquierda a derecha).

4.2.5. Preparación de las mezclas binarias

Se prepararon tres mezclas binarias de nanopartículas de cobre y oligómeros de quitosano (CuNPs-QuiOli) con el fin de comprobar si existe efecto sinérgico entre ellas frente al hongo (Figura 10).

Para ello se mezclan las disoluciones de CuNPs 3000 ppm y 1000 ppm con las de QuiOli 10 mg/ml y 5 mg/ml respectivamente, en proporción 1:1 en volumen, con lo que se obtienen sendas disoluciones con concentraciones CuNPs 1500 ppm-QuiOli 5 mg/ml y CuNPs 500 ppm-QuiOli 2,5 mg/ml.

La tercera mezcla se hizo con la disolución de CuNPs 5000 ppm y la de QuiOli 20 mg/ml en proporción 2:3 en volumen. La concentración de la disolución obtenida fue de CuNPs 2000 ppm-QuiOli 12 mg/ml.

Para homogeneizar y garantizar la interacción entre ambos compuestos, las 3 mezclas se sonicaron a 20000 Hz durante 1 minuto (Figura 9).



Figura 9. Sonicación de una mezcla de CuNPs/QuiOli.

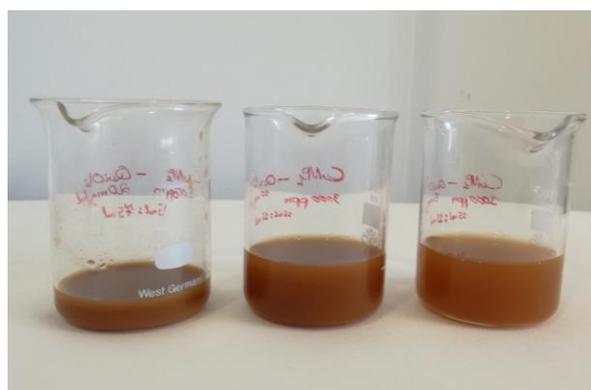


Figura 10. Mezclas binarias obtenidas: CuNPs 2000 ppm-QuiOli 12 mg/ml, CuNPs 1500 ppm-QuiOli 5 mg/ml y CuNPs 500 ppm-QuiOli 2,5 mg/ml (de izquierda a derecha)

4.3. Caracterización de los compuestos

Para caracterizar los compuestos sintetizados se utilizaron las siguientes técnicas:

I. Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)

Se obtuvieron los espectros UV-Vis en el rango 300-800 nm de la dispersión de CuNPs 3000 ppm, de la disolución de QuiOli 5 mg/ml y de la mezcla binaria CuNPs 1500 ppm-QuiOli 5 mg/ml. Además, los espectros fueron sometidos a deconvolución para determinar las longitudes de onda a las que se dan los picos de absorbancia.

Se realizó asimismo el estudio de la relación concentración-absorbancia para las CuNPs con el fin de ajustar la curva resultante a la Ley de Beer, expresada en la siguiente fórmula:

$$A = \varepsilon \cdot C$$

Donde ε es el coeficiente de extinción, o constante de la ley de Beer, y C se corresponde con la concentración, expresada en ppm.

II. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier y reflexión total atenuada (ATR -FTIR)

Se obtuvieron los espectros vibracionales de las CuNPs y la mezcla binaria CuNPs-QuiOli en el rango 400-4000 cm^{-1} , a temperatura ambiente, con una resolución espectral de 1 cm^{-1} y 64 barridos.

III. Difracción de rayos X de polvo cristalino (XRPD)

La cristalinidad de las CuNPs y de la mezcla binaria CuNPs-QuiOli fueron determinadas en geometría de reflexión, empleando radiación Cu K α ($\lambda=1.5406$ Å). Los difractogramas se obtuvieron por exploración continua sobre un ángulo de difracción $2\theta = 5-80^\circ$.

IV. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La dispersión de CuNPs fue estudiada mediante SEM con el fin de observar la morfología de las nanopartículas y encontrar información estructural complementaria a la obtenida mediante la difracción de rayos X.

4.4. Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica frente a *Trametes versicolor*

4.4.1. Primer ensayo: evaluación mediante el método de dilución en agar

La evaluación de la actividad antifúngica de los compuestos obtenidos fue llevada a cabo mediante el método de dilución en agar, "agar dilution method" (también conocido como técnica del alimento envenenado, "poisoned food technique"), recomendado cuando se trabaja con hongos (Balouiri, Sadiki, & Ibensouda, 2016). El objetivo principal es determinar la MIC (Minimum Inhibitory Concentration), que se define como la concentración mínima del compuesto que inhibe totalmente el

crecimiento visible del hongo bajo condiciones de crecimiento apropiadas (Balouiri et al., 2016), además de las curvas de crecimiento, que representan la actividad antifúngica a distintas concentraciones y momentos. También se pretende clasificar los distintos tratamientos en grupos que presenten una actividad antifúngica estadísticamente similar, así como averiguar el posible efecto sinérgico establecido entre las nanopartículas de cobre y los oligómeros de quitosano.

Para ello, con cada tratamiento se prepara un medio de cultivo en el que se adiciona y se reparte homogéneamente una determinada cantidad de compuesto de acuerdo con la concentración de éste que se quiere evaluar. El hongo es inoculado en su superficie, y su desarrollo a lo largo del tiempo se registra hasta que el tratamiento control llega al límite de crecimiento establecido, momento en el cual se toma la medición definitiva que servirá para evaluar la actividad antifúngica del tratamiento.

En nuestro caso, el medio de cultivo es PDA, y los recipientes en los que se desarrolla el ensayo placas Petri de 85 mm x 14 mm. El PDA fue preparado de acuerdo con las instrucciones recomendadas por el fabricante, siendo esterilizado previamente a su uso mediante un proceso de autoclavado a 121 °C durante 15 minutos. En cada una de las placas se vertió una mezcla de 2,5 ml del compuesto a evaluar, agua destilada en el caso del tratamiento control, y 22,5 ml de PDA (proporción 1:9), sumando 25 ml en total. Cuando el medio de cultivo hubo solidificado se inoculó el hongo depositando en su superficie un fragmento rectangular de micelio de aproximadamente 5 mm x 6 mm, obtenido de una placa de cultivo de la cepa aislada. Las placas inoculadas permanecieron en una cámara de cultivo en ausencia de luz y a 27 °C, temperatura situada en el rango óptimo de crecimiento para *T. versicolor* según Boddy (1983).

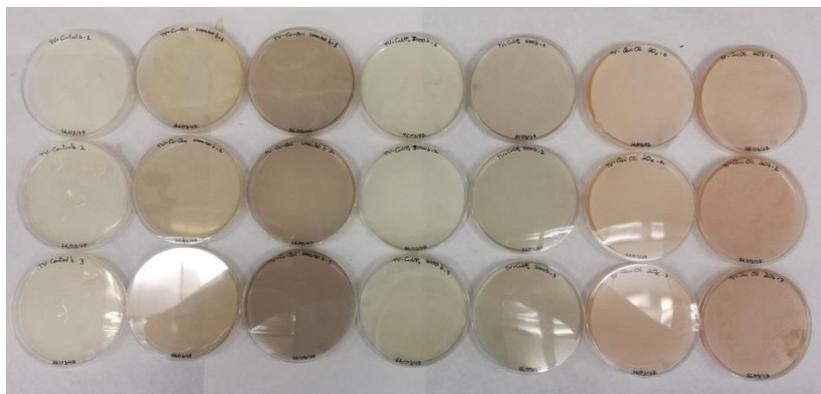


Figura 11. Placas Petri con 3 réplicas de diversas mezclas de PDA y compuesto a evaluar preparadas para ser inoculadas con el hongo.

Se realizaron tres réplicas por tratamiento (Figura 11), que fueron en total diecisiete: cinco concentraciones de los compuestos individuales y de la mezcla binaria y una del sobrenadante y del control (Tabla 1). La evaluación cuantitativa del crecimiento del micelio se realizó mediante la medición diaria, a partir del tercer día desde el inicio del ensayo, del diámetro del mismo a lo largo de dos ejes perpendiculares entre sí. Por lo tanto, se tomaron dos datos de diámetro por réplica, siendo en total seis los datos obtenidos por cada tipo de tratamiento y día.

Las curvas de crecimiento se elaboraron a partir de la media aritmética de los seis datos de diámetro diario obtenidos por tratamiento, incluyendo en ellas la representación de la desviación estándar de cada conjunto de datos. Cuando no hubo crecimiento del micelio, se introdujo como valor del diámetro el de la media de los lados del inóculo depositado sobre la placa (0,55 cm).

Para obtener el porcentaje de actividad antifúngica (expresada como reducción del crecimiento respecto al tratamiento control) se utilizó la siguiente fórmula (Balouiri et al., 2016):

$$\text{Actividad antifúngica (\%)} = \frac{D_C - D_S}{D_C} \times 100$$

Donde D_C es el diámetro del micelio en el tratamiento control y D_S el diámetro del micelio en el tratamiento a evaluar (media aritmética de los seis datos), ambos referidos al día de finalización del ensayo, cuando en el tratamiento control el hongo se ha extendido a toda la placa. La MIC de cada compuesto se corresponde con la concentración mínima que hace que la actividad antifúngica sea del 100 %.

Las concentraciones finales evaluadas de cada compuesto, calculadas respecto a los 25 ml totales de cada placa, se muestran en la Tabla 1. En el caso de las CuNPs, se preparó el ensayo con las dispersiones 5000 ppm, 3000 ppm y 1000 ppm.

Tabla 1. Concentraciones finales de cada compuesto evaluadas por tratamiento.

Compuesto (ud. de medida)	Concentraciones en cada tratamiento				
	1	2	3	4	5
CuNPs (ppm)	35	110	180	300	500
QuiOli (mg/ml)	0,18	0,36	0,90	1,50	2,50
CuNPs-QuiOli (ppm-mg/ml)	18-0,09	55-0,18	70-0,45	150-0,50	250-1,00
Sobrenadante (% en volumen)	10	-	-	-	-
Control (% en volumen)	10	-	-	-	-

La disolución sobrenadante se evaluó para comprobar el posible efecto sobre el crecimiento del hongo de los restos de disolución que quedaron en la suspensión de CuNPs tras retirar la mayoría con la pipeta.

Además, se realizó una evaluación cualitativa basada en la observación directa del aspecto presentado por el micelio del hongo en función del tipo de tratamiento al que fue sometido, con el fin de determinar las diferencias observables en la acción antifúngica de cada uno de ellos.

Por último, el hecho de que los compuestos a evaluar presenten tan altas diferencias de pH requiere que se valore su posible efecto sobre el crecimiento del hongo. Castro Silva (2015) reporta que tras evaluar el crecimiento de *T. versicolor* en PDA con soluciones de pH 4, pH 6,5 y pH 10 no se apreció diferencia significativa alguna, por lo

que se descarta la posibilidad de una influencia apreciable del pH en los resultados de los ensayos.

4.4.1.1. Tratamiento estadístico de los datos obtenidos

El conjunto de datos generados durante el ensayo debió ser sometido a distintos procedimientos estadísticos. El software empleado para ello fue el programa STATGRAPHICS Centurion XVII (versión 17.1.12).

En primer lugar se llevó a cabo un análisis descriptivo de los datos (estadística descriptiva), en el que para cada día del ensayo y tratamiento se obtuvieron el promedio de los seis diámetros medidos, sus valores mínimo y máximo, su desviación estándar y el coeficiente de variación.

Con los promedios y las desviaciones estándar de todos los días de medición se obtuvieron las curvas de crecimiento correspondientes a cada tratamiento, mientras que para la obtención de las MIC se empleó el valor promedio de los diámetros correspondientes al último día del ensayo (aquel en el que el tratamiento control llega al límite de crecimiento).

A continuación se llevó a cabo la comprobación de la normalidad de los datos (diámetros) obtenidos el último día del ensayo, paso imprescindible para realizar la estadística comparativa. Para ello se empleó tanto el análisis visual como el basado en los test de normalidad. En cuanto al análisis visual, se recurrió al gráfico cuantil-cuantil (Q-Q plot), por ser más adecuado cuando el número de datos no es lo suficientemente elevado que la simple observación del histograma. Por otra parte, el test de normalidad que se empleó fue la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Una vez realizadas estas comprobaciones se llevaron a cabo los procedimientos estadísticos necesarios para obtener la clasificación de los distintos tratamientos en grupos homogéneos y para estudiar el posible efecto sinérgico entre los compuestos (estadística comparativa).

Respecto a lo primero, se empezó por comprobar que existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos mediante la realización de un análisis de la varianza con un solo factor (ANOVA one-way). Además de verificar el valor-P asociado a la varianza entre grupos, se comprobó que los errores (residuos) del ANOVA seguían una distribución normal (gráfico cuantil-cuantil y prueba de Kolmogorov-Smirnov), su media era próxima a cero y su varianza homogénea (prueba de Bartlett). Superado este paso, se recurrió al empleo de una prueba de rango múltiple para detectar cuáles eran los tratamientos estadísticamente diferentes y así poder clasificarlos en distintos grupos homogéneos. El método seguido para ello fue el HSD de Tukey (“Honestly Significant Difference”) con un 95 % de confianza, más apropiado que otros como el LSD (“Least Significant Difference”) cuando el número de posibles comparaciones es elevado.

Para estudiar el posible efecto sinérgico entre las nanopartículas de cobre y los oligómeros de quitosano se recurrió al empleo de un análisis de la varianza con dos

factores (ANOVA two-way). Tal y como argumenta Slinker (1998), la relación aditiva o no aditiva existente entre dos factores, base teórica de la interacción sinérgica, halla su correspondencia en el análisis de la relación de interacción entre factores evaluada por el estadístico F del ANOVA two-way. Además, para poder llevar a cabo un análisis de la sinergia basado en este método es necesario realizar un diseño experimental que incluya las siguientes cuatro posibles combinaciones de los dos factores a evaluar: (A) primer tratamiento solo, (B) segundo tratamiento solo, (C) ambos tratamientos a la vez y (D) ningún tratamiento (Slinker, 1998).

En nuestro caso, pese a que se evaluaron los dos compuestos (CuNPs y QuiOli) tanto por separado como combinados en la mezcla binaria, las concentraciones de este último tratamiento no coinciden con las empleadas en los primeros, por lo que se hizo necesario la realización de dos regresiones lineales mínimo cuadráticas con el fin de pronosticar el valor adquirido por la variable diámetro con las concentraciones de CuNPs y QuiOli empleadas en el tratamiento de mezcla. De esta manera se pudo disponer de los dos factores necesarios para la realización del ANOVA two-way, que se correspondieron con las concentraciones de CuNPs y QuiOli de 150 ppm y 0,50 mg/ml respectivamente.

La validación estadística de las regresiones se llevó a cabo mediante la revisión de los valores tomados por el coeficiente de correlación de Pearson (indicativo de la relación lineal entre las dos variables) y el coeficiente de determinación (R^2 , porcentaje de la varianza explicada por la regresión). En cuanto a la asignación de los valores tomados por la variable diámetro, además de la predicción directa mediante el empleo de la ecuación del modelo ajustado por la regresión, se incluyeron unos valores máximo y mínimo a partir de la suma y resta del error estándar del estimado. De este modo se aumenta la variabilidad y el realismo de los datos empleados.

Una vez realizadas las dos regresiones lineales, ya se dispone de las cuatro combinaciones necesarias para el análisis de la sinergia: (A) CuNPs 150 ppm (primer tratamiento solo), (B) QuiOli 0,50 mg/ml (segundo tratamiento solo), (C) CuNPs-QuiOli 150 ppm-0,50 mg/ml (ambos tratamientos a la vez) y (D) control (ningún tratamiento). Para que el análisis resulte lo más certero posible es necesario que el número de datos empleados en las cuatro combinaciones sea el mismo, tres en nuestro caso, por lo que se han excluido tres de los seis datos disponibles (todos idénticos) para la combinación D (tratamiento control) y se han utilizado los promedios de los dos diámetros correspondientes a cada placa de la combinación C (CuNPs-QuiOli 150 ppm-0,50 mg/ml).

Tras realizar el ANOVA two-way y analizar la relación de interacción entre factores, se comprobó que los errores (residuos) del ANOVA seguían una distribución normal (prueba de Kolmogorov-Smirnov), su media era próxima a cero y su varianza homogénea (gráfico de residuos vs. predichos), requisitos imprescindibles para validar el procedimiento.

4.4.2. Segundo ensayo: evaluación en madera de *Populus sp.* impregnada con los compuestos

Una vez que se determinó la MIC de los diversos compuestos mediante la dilución en agar, se llevó a cabo un nuevo ensayo para probar su efectividad frente al hongo de pudrición blanca *Trametes versicolor* mediante un tratamiento de inmersión en madera de *Populus sp.*

Para ello se prepararon dos disoluciones con diferente concentración de cada uno de los tres compuestos evaluados (Tabla 2). Una de ellas se corresponde con la MIC determinada anteriormente, y la otra con el cuádruple de ésta, debido al hecho de que al ser absorbidos por las probetas de madera, la concentración real de los compuestos disminuye considerablemente, y se hace necesario disponer de probetas en las que la correcta impregnación esté asegurada mediante una elevada concentración del compuesto. En el caso de las CuNPs, las dos disoluciones empleadas fueron elaboradas a partir de las dispersiones originales de CuNPs 5000 ppm y 3000 ppm.

Tabla 2. Concentraciones de las disoluciones empleadas en la impregnación de la madera.

Compuesto (ud. de medida)	Concentración 1	Concentración 2
CuNPs (ppm)	500	2000
QuiOli (mg/ml)	1,5	6
CuNPs-QuiOli (ppm-mg/ml)	250-1	1000-4
Control	(agua)	-

Se emplearon probetas de madera de *Populus sp.* con unas dimensiones de 20 mm x 9,5 mm x 7 mm en húmedo, por lo tanto con un volumen de 1,33 cm³, y placas Petri de las mismas dimensiones que en el anterior ensayo (85 mm x 14 mm), en las que se cultivó el hongo (*Trametes versicolor*) sobre PDA durante siete días, hasta que cubrió por entero las placas.

Las probetas de madera se mantuvieron durante un día en una estufa a 103 °C, tras lo cual se pesaron para obtener el peso anhidro de cada una de ellas. Inmediatamente después se sumergieron durante una hora en las disoluciones para que absorbieran los compuestos, y finalmente se mantuvieron otra hora en una estufa a 50 °C para que perdieran el agua adquirida y los compuestos quedaran adheridos en su estructura interna, sin que sufrieran transformaciones por elevadas temperaturas.

En cada placa se depositaron cinco probetas sobre el micelio ya desarrollado, y por cada tratamiento se dispusieron cuatro placas, de tal manera que en total se emplearon 28 placas y 140 probetas (Figura 12).

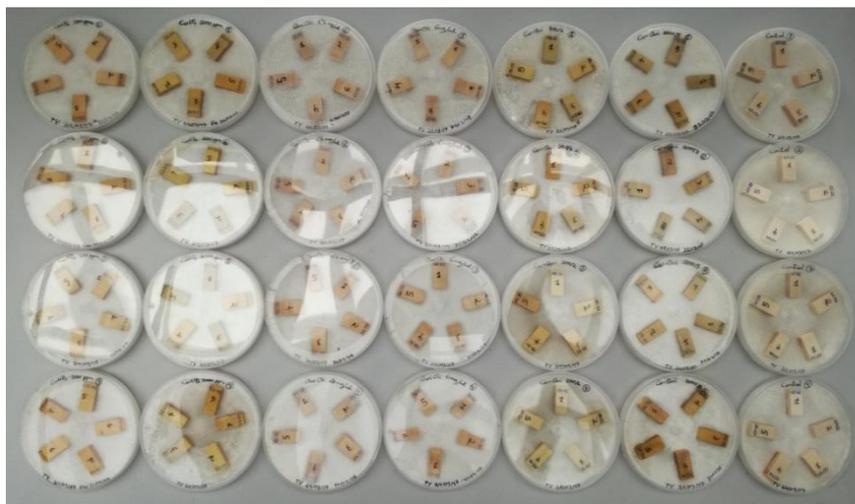


Figura 12. Placas Petri dispuestas para el ensayo de evaluación de protección de la madera por parte de los compuestos. Cinco probetas por placa impregnadas y depositadas sobre el hongo ya desarrollado.

Se realizaron cuatro evaluaciones periódicas de la degradación; la primera a los 15 días desde el inicio del ensayo, y las restantes cada 10 días a partir de la primera (a los 25 días, 35 días y 45 días, por lo tanto). En cada una de estas evaluaciones se retiraron las cinco probetas de una misma placa por tratamiento y se extrajo el micelio adherido a las mismas con la ayuda de pinzas y bisturí. Posteriormente se secaron durante un día a 103 °C y se volvieron a pesar. De esta manera se determinó el grado de degradación de la madera mediante el cálculo de la pérdida de peso experimentada, que se refleja en la diferencia entre los pesos anhidro anterior y posterior a la exposición al hongo de las probetas. La fórmula utilizada para expresar este dato en forma de porcentaje es la siguiente:

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = \frac{(P_{0a} - P_{0p})}{P_{0a}} \times 100$$

Donde P_{0a} es el peso anhidro anterior al ensayo con el hongo y P_{0p} es el peso anhidro posterior al mismo. Los datos correspondientes al día 45 serán los utilizados a la hora de establecer las comparaciones finales entre tratamientos, pues es aquel en el que los diferentes compuestos han dispuesto de más tiempo para expresar su efecto frente al hongo.

Además, se llevó a cabo una evaluación cualitativa para valorar el grado de colonización de las probetas de madera por parte del hongo. La colonización externa o superficial se valoró mediante la simple observación directa de las probetas dispuestas en contacto con el micelio. Para la colonización interna, se realizaron una serie de micrografías de cortes transversales de las probetas retiradas el día 45 del ensayo con el fin de detectar la presencia/ausencia de hifas en el interior de los vasos conductores. Los cortes fueron realizados mediante el microtomo de deslizamiento con un grosor de 20-35 μm , siendo las muestras posteriormente teñidas con safranina para su observación en el microscopio.

4.4.2.1. Tratamiento estadístico de los datos obtenidos

Al igual que con el método de dilución en agar, primero se llevó a cabo un análisis descriptivo de los datos (estadística descriptiva), en el que para cada día del ensayo y tratamiento se obtuvieron el promedio de los cinco datos de pérdida de peso (expresados en porcentaje), sus valores mínimo y máximo, su desviación estándar y el coeficiente de variación. Con los datos del promedio y la desviación estándar se hizo el gráfico de evolución en el tiempo de la pérdida de peso de las probetas por tratamiento.

A continuación se realizó la estadística comparativa, que consistió en el establecimiento de grupos homogéneos de tratamientos en función de los resultados obtenidos el último día de toma de datos (día 45). Para ello se empleó en primer lugar un análisis de la varianza con un solo factor (ANOVA one-way), con el fin de comprobar que existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos. Tras comprobar que los errores (residuos) del ANOVA seguían una distribución normal (gráfico cuantil-cuantil y pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk), su media era próxima a cero y su varianza homogénea (prueba de Bartlett), se procedió a realizar una prueba de rango múltiple para detectar qué tratamientos eran estadísticamente diferentes. El método empleado fue el LSD de Fisher con un 95 % de confianza, pues el número de comparaciones era bajo.

5. Resultados y discusión

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización de los compuestos

5.1.1. Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)

La Figura 13 muestra el espectro UV-Vis de la dispersión de nanopartículas de cobre (CuNPs) 3000 ppm, acompañado por las curvas de ajuste de picos resultantes de la deconvolución. El pico de absorbancia situado a 458 nm de longitud de onda indica la presencia de nanopartículas de óxido de cobre (I) (nanopartículas de Cu_2O o de cuprita), tal y como reportan Blosi, Albonetti, Dondi, Martelli, & Baldi (2011) y Karthik & Geetha (2014).

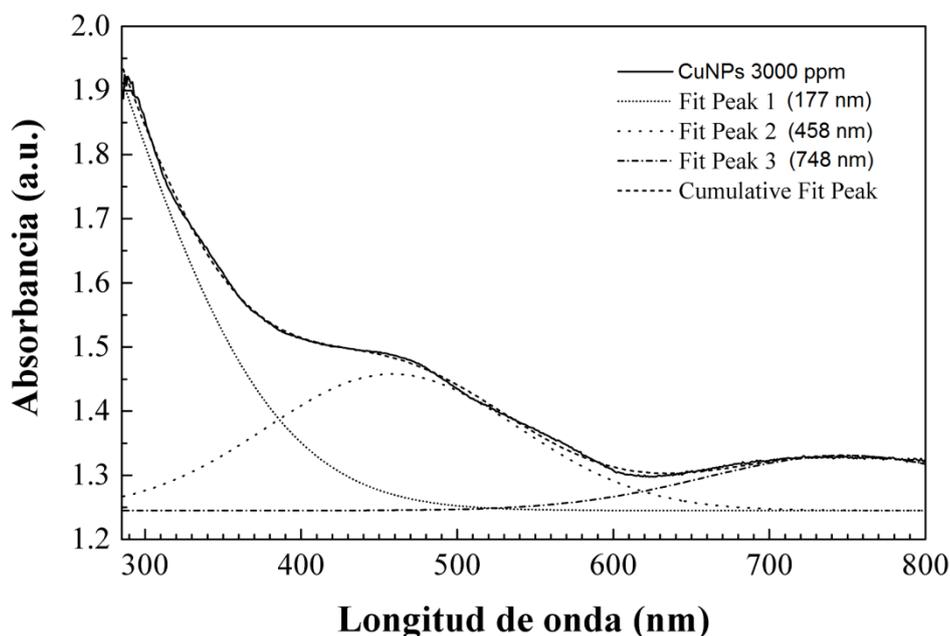


Figura 13. Espectro UV-Vis de la dispersión de CuNPs 3000 ppm acompañado por las curvas de deconvolución.

La Figura 14 muestra la curva de calibración original, generada a partir de lecturas de absorbancia de diferentes concentraciones de CuNPs a una longitud de onda de 458 nm. En ella se observa la existencia de dos tramos bien diferenciados: el primero correspondiente a las dispersiones a bajas concentraciones (125-500 ppm) y el segundo a las más concentradas (> 500 ppm). Teniendo en cuenta este hecho, se han establecido dos rectas de calibrado que reflejan los distintos comportamientos evidenciados. Ambas rectas se han ajustado sobre la curva original de la Figura 14 siguiendo la ley de Beer.

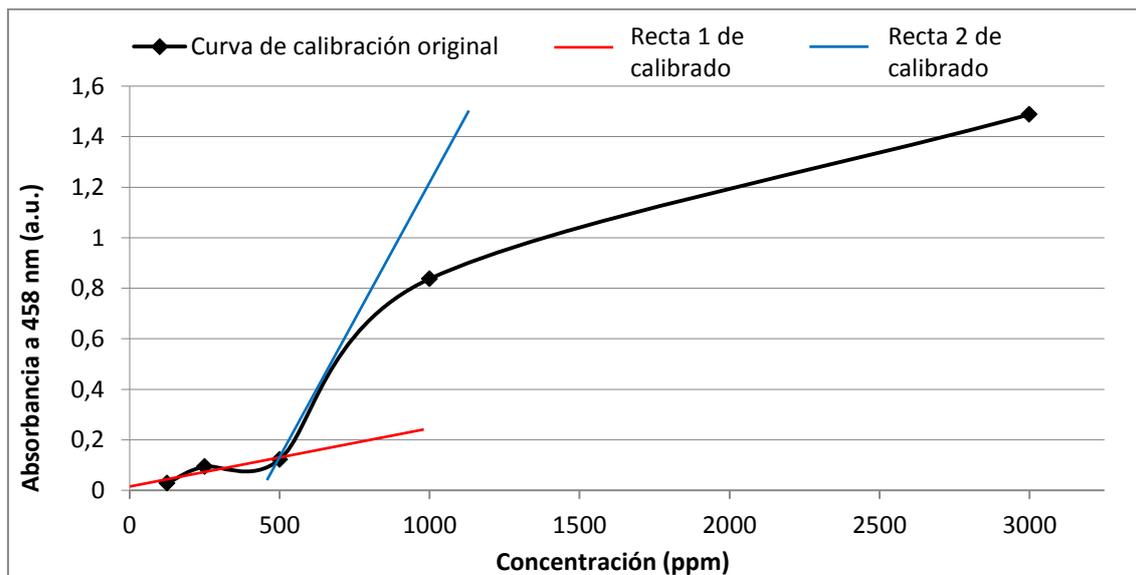


Figura 14. Curva de calibración original de las CuNPs a 458 nm de longitud de onda y rectas de calibrado ajustadas.

Los principales parámetros de la regresión lineal llevada a cabo para el ajuste de la primera recta se recogen en la Tabla 3, así como los coeficientes (intercepto y pendiente) de ambas. La pendiente de cada recta se corresponde con el coeficiente de extinción (ϵ).

Las fórmulas correspondientes a la ley de Beer de cada recta de calibrado son las siguientes:

$$\text{Recta 1: } A = 0,0147 + 0,000229829 \cdot C$$

$$\text{Recta 2: } A = -0,802641 + 0,00185028 \cdot C$$

Tabla 3. Principales parámetros de las rectas de calibrado ajustadas.

	Intercepto	Pendiente (ϵ)	Coefficiente de correlación de Pearson	Coefficiente de determinación (R^2)
Recta 1 (0-500 ppm)	0,0147	0,000229829	0,917014	84,0914 %
Recta 2 (> 500 ppm)	-0,802641	0,00185028	-	-

La Figura 15 muestra el espectro UV-Vis de la disolución de oligómeros de quitosano (QuiOli) 5 mg/ml, acompañado por la curva de deconvolución que muestra un pico de absorción a 304 nm. El espectro concuerda con el obtenido por Kang, Dai, Zhang, & Chen (2007).

En la Figura 16 está representado el espectro UV-Vis de la mezcla binaria de nanopartículas de cobre y oligómeros de quitosano CuNPs 1500 ppm-QuiOli 5 mg/ml. La deconvolución muestra un pico de absorción a 458 nm que se corresponde con las nanopartículas de óxido de cobre (I) contenidas en la mezcla.

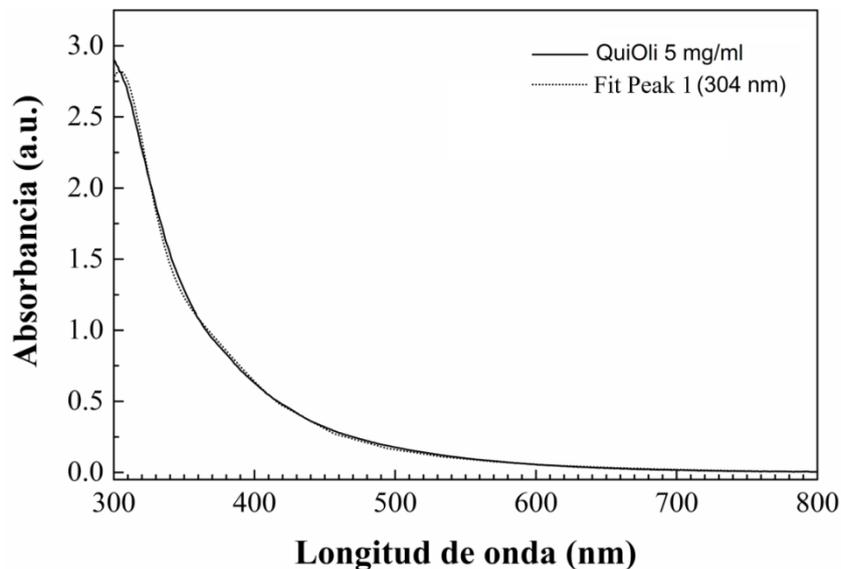


Figura 15. Espectro UV-Vis de la disolución de QuiOli 5 mg/ml acompañado por la curva de deconvolución.

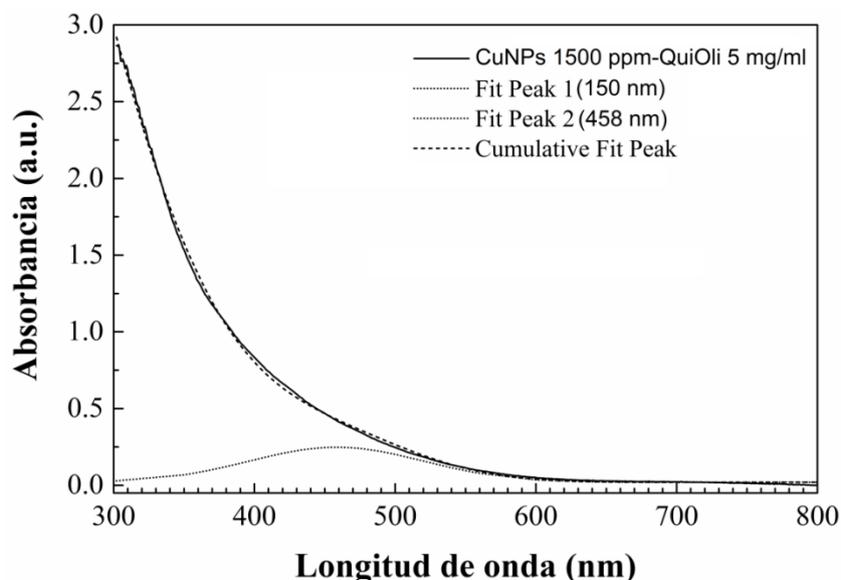


Figura 16. Espectro UV-Vis de la mezcla binaria CuNPs 1500 ppm-QuiOli 5 mg/ml.

5.1.2. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier y reflexión total atenuada (ATR-FTIR)

Las bandas características observadas a los números de onda 431-433 y 614-606 cm^{-1} (Figura 17 y Tabla 4) son asignables tanto al modo Au y al modo Bu de CuO (Kliche & Popovic, 1990) como a la vibración de la red del Cu_2O .

Los picos de absorción de IR en torno a los números de onda 1047, 1202 y 1632 cm^{-1} muestran que la superficie de las NP de Cu_2O se encuentran sobre un sustrato que posee los grupos funcionales CN, CH y NH, respectivamente (es decir, quitosano).

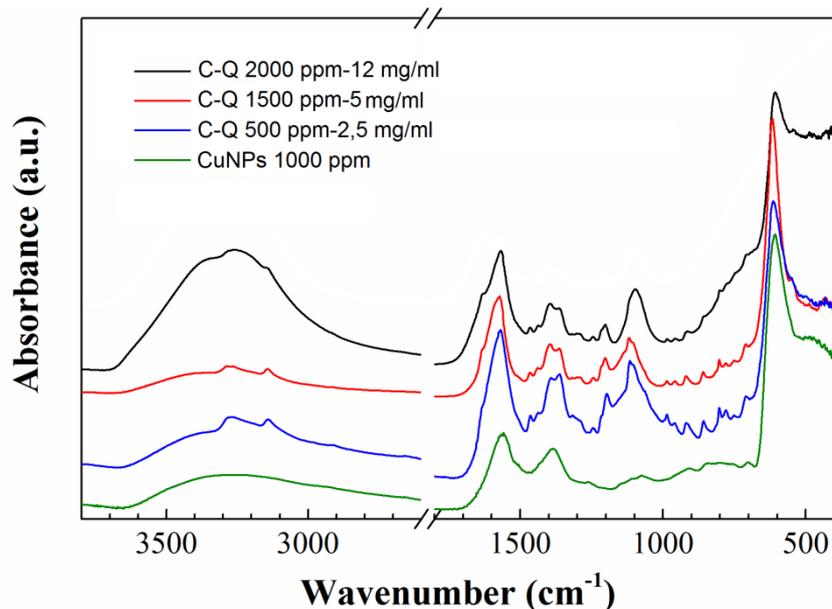


Figura 17. Espectros FTIR de las CuNPs y las mezclas binarias CuNPs-QuiOli mostrando dos bandas de absorción características de los óxidos CuO y Cu₂O: 431-433 cm⁻¹ (A_u) y 614-606 cm⁻¹(B_u).

Tabla 4. Principales bandas de los espectros ATR-FTIR de las mezclas binarias y las CuNPs. Números de onda en cm⁻¹.

Muestra	Bandas											
CuNPs 2000 ppm-QuiOli 12 mg/ml	3262	1567	1465	1394	1245	1202		1096		606	488	429
CuNPs 1500 ppm-QuiOli 5 mg/ml	3285 3142	1571	1465	1395	1243	1202	1119	986	919 859	617		433
CuNPs 500 ppm-QuiOli 2,5 mg/ml	3268 3141	1568		1362		1196	1115	986	920 858	614		431
CuNPs 1000 ppm	3263	1558		1385			1075			612	503	433

5.1.3. Difracción de rayos X de polvo cristalino (XRPD)

El difractograma de polvo (Figura 18) de la mezcla binaria compuesta por nanopartículas de cobre (I) y oligómeros de quitosano (CuNPs-QuiOli) muestra picos característicos que aparecen a distancias 2θ: 21.5° (quitosano), 29.5° y 31° (Cu₂O), 35.9-36° (Cu₂O) y 43.5° (Cu). Las relativamente bajas intensidades observadas son coherentes con la baja cristalinidad del compuesto. Las asignaciones de picos han sido realizadas en comparación con los difractogramas de referencia para quitosano (Figura 19), Cu₂O y Cu (Figura 20 y Figura 21). Se puede extraer como primera conclusión que las CuNPs sintetizadas se hayan formadas principalmente por Cu₂O, aunque con pequeñas trazas de Cu.

En otro estudio de un material compuesto formado por grafeno como matriz y nanocobre como particulado (Primo et al., 2015) han encontrado que las nanopartículas de cobre orientadas (111) han experimentado oxidación espontánea sobre quitosano para proporcionar nanoplacas de óxido de cobre (I) orientadas (200). El hecho de que el material compuesto contenga este tipo de nanoplacas de Cu_2O orientadas sugiere un comportamiento catalítico con números que pueden ser tres órdenes de magnitud más alto que el esperado (acoplamiento de tipo Ullmann).

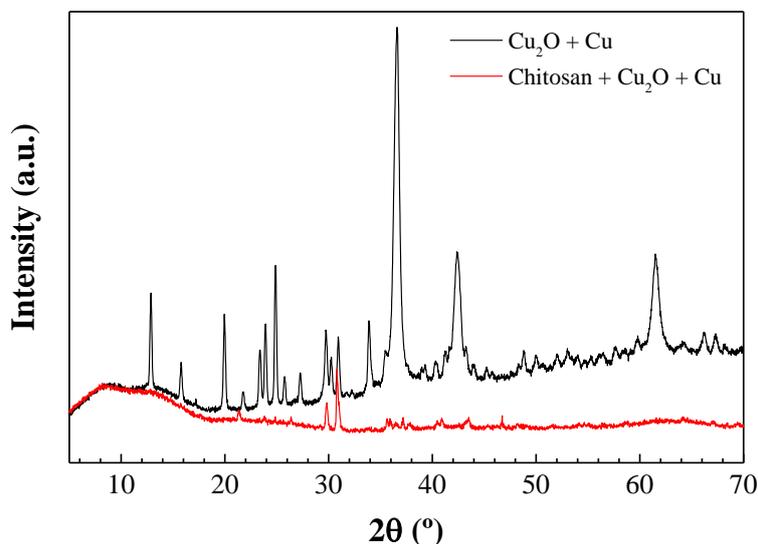


Figura 18. Difractograma de polvo (XRPD) de la dispersión CuNPs 3000 ppm ($\text{Cu}_2\text{O} + \text{Cu}$) y de la mezcla binaria CuNPs-QuiOli 1500 ppm-5mg/ml (Chitosan + $\text{Cu}_2\text{O} + \text{Cu}$). Los picos característicos son los que aparecen a distancias 2θ : 21.5° (quitosano), 29.5° y 31° (Cu_2O), 35.9-36° (Cu_2O) y 43.5° (Cu).

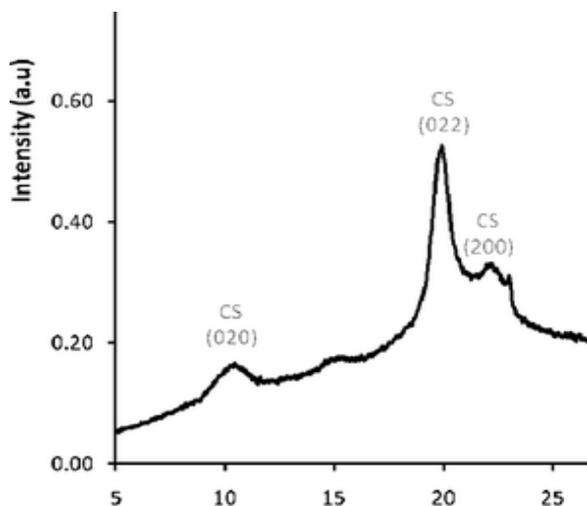


Figura 19. Difractograma referencia de polvo de rayos X de quitosano. Los picos e intensidades características son los que aparecen a distancias 2θ : 11.5° (020), 20° (022) y 22° (200).

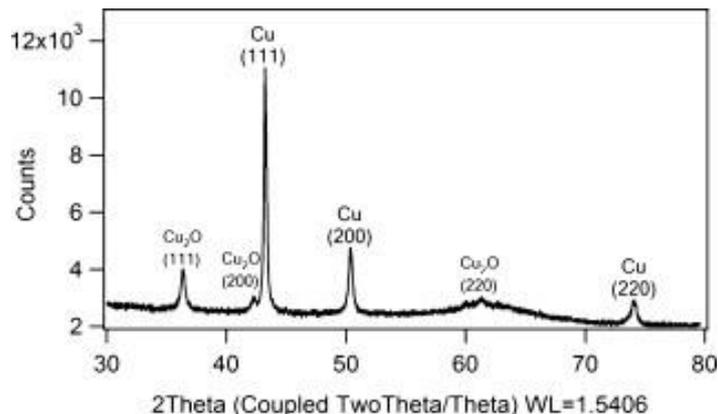


Figura 20. Difractograma referencia de polvo de rayos X de nanopartículas de cobre parcialmente oxidadas a óxido de cobre (I). Los picos característicos aparecen a distancias 2θ: 37° (Cu₂O), 42° (Cu₂O), 43° (Cu), 50.5° (Cu), 62° (Cu₂O) y 74° (Cu).

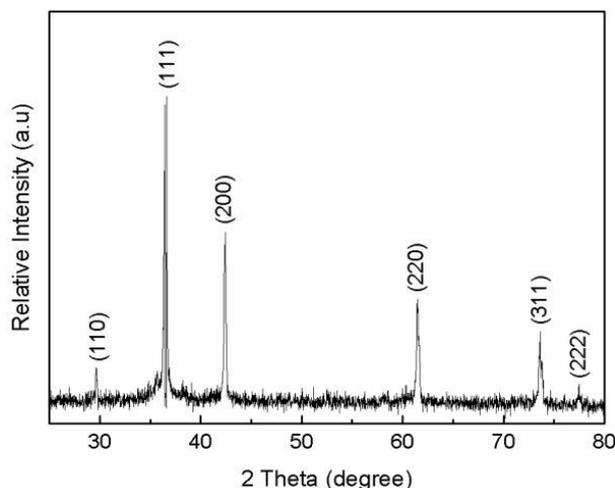


Figura 21. Difractograma de referencia de polvo de rayos X de microesferas porosas huecas de Cu₂O (JCPDS 05-0667). Los picos e intensidades característicos son los que aparecen a distancias 2θ: 29° (110), 36.5° (111), 42.5° (200), 62° (220), 74° (311) y 77.5° (222).

5.1.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La Figura 22 muestra una imagen SEM correspondiente a las nanopartículas de óxido de cobre (I) sintetizadas. Como puede observarse, estas presentan forma esférica y su tamaño se sitúa entre 65 nm y 125 nm.

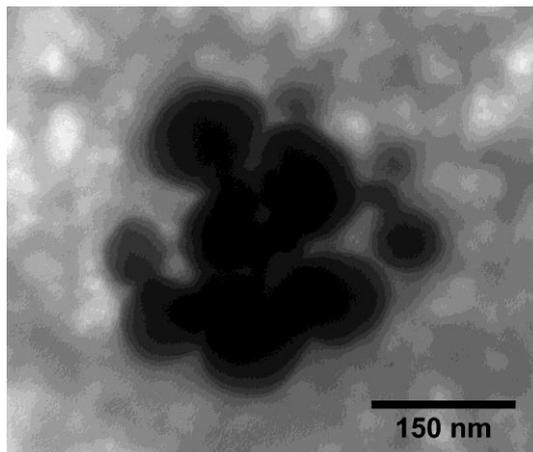


Figura 22. Imagen SEM correspondiente a las nanopartículas de óxido de cobre (I) sintetizadas.

5.2. Actividad antifúngica frente a *Trametes versicolor*

5.2.1. Método de dilución en agar

Los resultados obtenidos del ensayo con el método de dilución en agar permiten establecer una MIC (Tabla 9) para los tres compuestos evaluados, así como descartar el efecto de la disolución sobrenadante sobre el crecimiento del hongo. La prueba de rango múltiple permite, además, ordenar los distintos tratamientos en función de su actividad antifúngica (de mayor a menor) y agruparlos en distintos conjuntos integrados por aquéllos que no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí (Tabla 13). Por último, el análisis de la sinergia permite concluir que no existe ninguna interacción de esta índole entre las CuNPs y los QuiOli con el método de síntesis empleado.

5.2.1.1. Estadística descriptiva, curvas de crecimiento y actividad antifúngica

En las Tablas 5, 6, 7 y 8 se muestran los principales parámetros estadísticos (promedio, mínimo, máximo, desviación estándar y coeficiente de variación) elaborados a partir de las mediciones del diámetro del hongo. Están referidos a cada tratamiento para los días 3, 4, 5 y 6 desde el inicio del ensayo, respectivamente. Puede observarse cómo el coeficiente de variación se mantiene siempre por debajo del 10 %, y en la mayoría de los tratamientos por debajo del 5 %, lo que indica una relativamente fuerte homogeneidad en la respuesta del hongo frente al tratamiento en las tres placas dispuestas por cada uno de ellos.

Tabla 5. Análisis descriptivo con los principales parámetros estadísticos del diámetro alcanzado por cada tipo de tratamiento el tercer día del ensayo mediante el método de dilución en agar.

Tratamiento	Casos	Promedio (cm)	Mínimo (cm)	Máximo (cm)	Desviación estándar	Coefficiente de Variación
Control	6	3,833	3,80	4,00	0,075	1,938 %
Sobrenadante	6	4,275	4,00	4,50	0,189	4,423 %
CuNPs 35 ppm	6	3,783	3,70	3,90	0,098	2,599 %
CuNPs 110 ppm	6	3,833	3,70	4,00	0,103	2,694 %
CuNPs 180 ppm	6	2,925	2,75	3,15	0,144	4,925 %
CuNPs 300 ppm	6	1,967	1,90	2,00	0,052	2,626 %
CuNPs 500 ppm	6	0,550	0,55	0,55	0,000	0,000 %
QuiOli 0,18 mg/ml	6	3,550	3,40	3,70	0,110	3,086 %
QuiOli 0,36 mg/ml	6	3,342	3,10	3,60	0,186	5,552 %
QuiOli 0,90 mg/ml	6	1,275	1,20	1,40	0,088	6,905 %
QuiOli 1,50 mg/ml	6	0,550	0,55	0,55	0,000	0,000 %
QuiOli 2,50 mg/ml	6	0,550	0,55	0,55	0,000	0,000 %
CuNPs-QuiOli 18 ppm-0,09 mg/ml	6	3,633	3,50	3,80	0,121	3,333 %
CuNPs-QuiOli 55 ppm-0,18 mg/ml	6	3,433	3,20	3,60	0,137	3,979 %
CuNPs-QuiOli 70 ppm-0,45 mg/ml	6	2,700	2,50	2,80	0,110	4,057 %
CuNPs-QuiOli 150 ppm-0,50 mg/ml	6	2,350	2,25	2,40	0,063	2,691 %
CuNPs-QuiOli 250 ppm-1 mg/ml	6	0,550	0,55	0,55	0,000	0,000 %

Tabla 6. Análisis descriptivo con los principales parámetros estadísticos del diámetro alcanzado por cada tipo de tratamiento el cuarto día del ensayo mediante el método de dilución en agar.

Tratamiento	Casos	Promedio (cm)	Mínimo (cm)	Máximo (cm)	Desviación estándar	Coefficiente de Variación
Control	6	5,583	5,40	5,80	0,147	2,636 %
Sobrenadante	6	5,883	5,70	6,20	0,183	3,119 %
CuNPs 35 ppm	6	5,358	5,10	5,65	0,220	4,106 %
CuNPs 110 ppm	6	5,483	5,40	5,50	0,041	0,745 %
CuNPs 180 ppm	6	3,783	3,65	3,90	0,103	2,730 %
CuNPs 300 ppm	6	2,708	2,60	2,90	0,120	4,433 %
CuNPs 500 ppm	6	0,550	0,55	0,55	0,000	0,000 %
QuiOli 0,18 mg/ml	6	4,592	4,50	4,70	0,102	2,223 %
QuiOli 0,36 mg/ml	6	4,375	4,05	4,70	0,219	4,995 %
QuiOli 0,90 mg/ml	6	1,800	1,60	1,95	0,161	8,958 %
QuiOli 1,50 mg/ml	6	0,550	0,55	0,55	0,000	0,000 %
QuiOli 2,50 mg/ml	6	0,550	0,55	0,55	0,000	0,000 %
CuNPs-QuiOli 18 ppm-0,09 mg/ml	6	4,867	4,80	5,00	0,082	1,678 %
CuNPs-QuiOli 55 ppm-0,18 mg/ml	6	4,433	4,20	4,60	0,137	3,082 %
CuNPs-QuiOli 70 ppm-0,45 mg/ml	6	3,492	3,35	3,55	0,092	2,627 %
CuNPs-QuiOli 150 ppm-0,50 mg/ml	6	3,175	3,10	3,30	0,082	2,588 %
CuNPs-QuiOli 250 ppm-1 mg/ml	6	0,550	0,55	0,55	0,000	0,000 %

Tabla 7. Análisis descriptivo con los principales parámetros estadísticos del diámetro alcanzado por cada tipo de tratamiento el quinto día del ensayo mediante el método de dilución en agar.

Tratamiento	Casos	Promedio (cm)	Mínimo (cm)	Máximo (cm)	Desviación estándar	Coefficiente de Variación
Control	6	7,675	7,50	7,90	0,133	1,736 %
Sobrenadante	6	7,883	7,70	8,10	0,147	1,867 %
CuNPs 35 ppm	6	7,250	6,90	7,40	0,187	2,580 %
CuNPs 110 ppm	6	7,333	7,20	7,55	0,125	1,707 %
CuNPs 180 ppm	6	4,983	4,85	5,20	0,137	2,742 %
CuNPs 300 ppm	6	3,675	3,50	3,90	0,154	4,193 %
CuNPs 500 ppm	6	0,550	0,55	0,55	0,000	0,000 %
QuiOli 0,18 mg/ml	6	6,058	5,90	6,20	0,102	1,685 %
QuiOli 0,36 mg/ml	6	5,650	5,35	5,90	0,195	3,450 %
QuiOli 0,90 mg/ml	6	2,558	2,35	2,75	0,169	6,589 %
QuiOli 1,50 mg/ml	6	0,550	0,55	0,55	0,000	0,000 %
QuiOli 2,50 mg/ml	6	0,550	0,55	0,55	0,000	0,000 %
CuNPs-QuiOli 18 ppm-0,09 mg/ml	6	6,442	6,35	6,55	0,074	1,143 %
CuNPs-QuiOli 55 ppm-0,18 mg/ml	6	5,783	5,55	5,95	0,147	2,545 %
CuNPs-QuiOli 70 ppm-0,45 mg/ml	6	4,358	4,25	4,50	0,086	1,976 %
CuNPs-QuiOli 150 ppm-0,50 mg/ml	6	4,108	3,95	4,20	0,097	2,362 %
CuNPs-QuiOli 250 ppm-1 mg/ml	6	0,550	0,55	0,55	0,000	0,000 %

Tabla 8. Análisis descriptivo con los principales parámetros estadísticos del diámetro alcanzado por cada tipo de tratamiento el sexto día del ensayo mediante el método de dilución en agar.

Tratamiento	Casos	Promedio (cm)	Mínimo (cm)	Máximo (cm)	Desviación estándar	Coefficiente de Variación
Control	6	8,500	8,50	8,50	0,000	0,000 %
Sobrenadante	6	8,500	8,50	8,50	0,000	0,000 %
CuNPs 35 ppm	6	8,358	8,00	8,50	0,225	2,686 %
CuNPs 110 ppm	6	8,467	8,30	8,50	0,082	0,964 %
CuNPs 180 ppm	6	6,558	6,35	6,80	0,159	2,431 %
CuNPs 300 ppm	6	4,717	4,60	4,90	0,129	2,737 %
CuNPs 500 ppm	6	0,550	0,55	0,55	0,000	0,000 %
QuiOli 0,18 mg/ml	6	7,667	7,55	7,80	0,093	1,214 %
QuiOli 0,36 mg/ml	6	7,075	6,85	7,30	0,172	2,438 %
QuiOli 0,90 mg/ml	6	3,508	3,25	3,75	0,211	6,007 %
QuiOli 1,50 mg/ml	6	0,550	0,55	0,55	0,000	0,000 %
QuiOli 2,50 mg/ml	6	0,550	0,55	0,55	0,000	0,000 %
CuNPs-QuiOli 18 ppm-0,09 mg/ml	6	8,092	8,00	8,15	0,049	0,608 %
CuNPs-QuiOli 55 ppm-0,18 mg/ml	6	7,150	6,80	7,40	0,226	3,158 %
CuNPs-QuiOli 70 ppm-0,45 mg/ml	6	5,350	5,20	5,45	0,105	1,960 %
CuNPs-QuiOli 150 ppm-0,50 mg/ml	6	5,342	5,20	5,55	0,146	2,740 %
CuNPs-QuiOli 250 ppm-1 mg/ml	6	0,550	0,55	0,55	0,000	0,000 %

Las Figuras 23, 24 y 25 representan las curvas de crecimiento de *Trametes versicolor* para cada grupo de tratamientos: nanopartículas de cobre, oligómeros de quitosano y compuestos binarios, respectivamente, mientras que la Figura 26 muestra el diámetro alcanzado por todos los tratamientos el sexto día del ensayo. La Tabla 9 muestra el porcentaje de reducción del crecimiento del hongo (actividad antifúngica) originado por cada tratamiento y la concentración mínima inhibitoria (MIC) asignada a cada uno de los compuestos.

En el caso de las nanopartículas de cobre (Figura 23), puede observarse cómo a partir de una concentración de 180 ppm el crecimiento del hongo se ve claramente afectado y disminuye, siendo completamente inhibido con 500 ppm, que es la concentración mínima inhibitoria (MIC). La disolución sobrenadante, sin embargo, no presenta ninguna actividad antifúngica, estando de hecho su curva de crecimiento algo por encima de la del tratamiento control en los días 3, 4 y 5, por lo que se descarta cualquier efecto inhibitorio de esta en el resto de tratamientos con CuNPs.

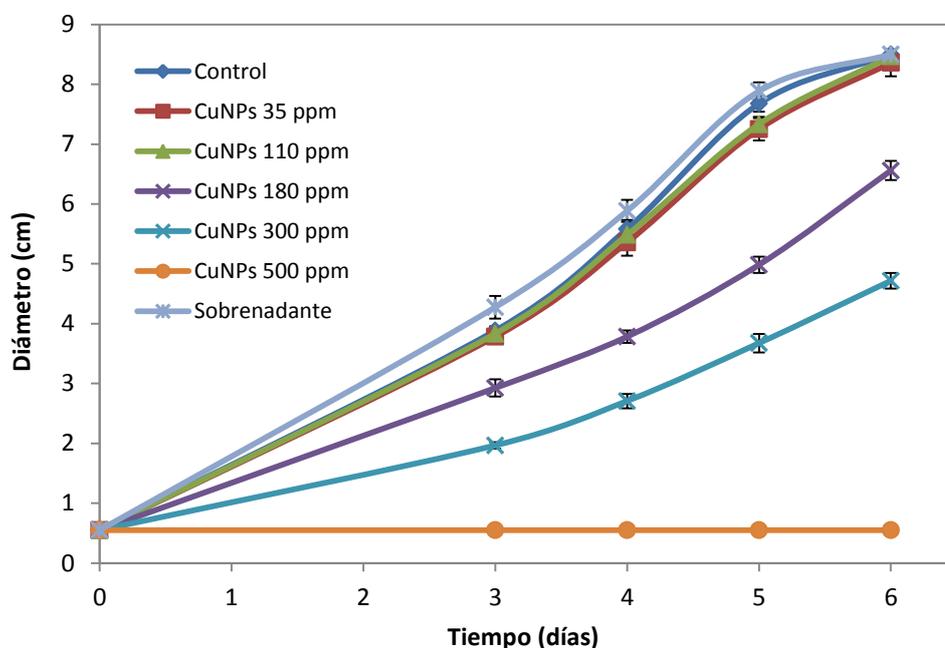


Figura 23. Curvas de crecimiento de *T. versicolor* para las distintas concentraciones de nanopartículas de cobre y disolución sobrenadante evaluadas con el método de dilución en agar. Cada punto representa la media de las tres réplicas y las barras de error indican su desviación estándar.

En el caso de los oligómeros de quitosano (Figura 24), es a partir de la concentración de 0,90 mg/ml cuando el crecimiento del hongo se ve claramente afectado (58,73 % de inhibición), siendo nulo con las concentraciones de 1,50 mg/ml y 2,50 mg/ml, por lo que queda establecida la MIC en 1,50 mg/ml.

Las mezclas de nanopartículas de cobre con oligómeros de quitosano (Figura 25) también arrojan un tratamiento que inhibe totalmente el crecimiento del hongo (250 ppm-1 mg/ml), y que por lo tanto se trata de la MIC.

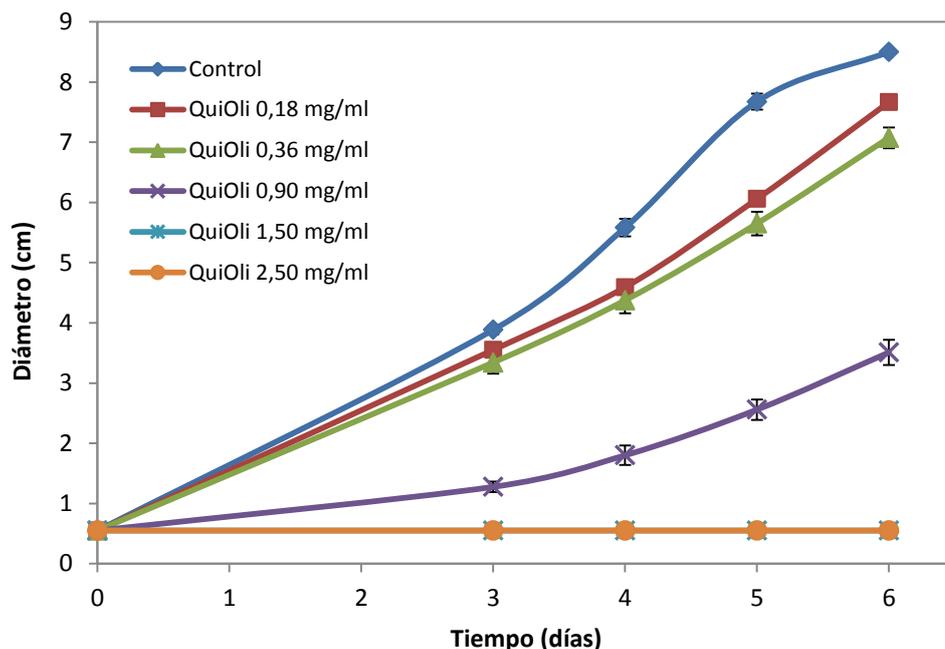


Figura 24. Curvas de crecimiento de *T. versicolor* para las distintas concentraciones de oligómeros de quitosano del ensayo con el método de dilución en agar. Cada punto representa la media de las tres réplicas y las barras de error indican su desviación estándar.

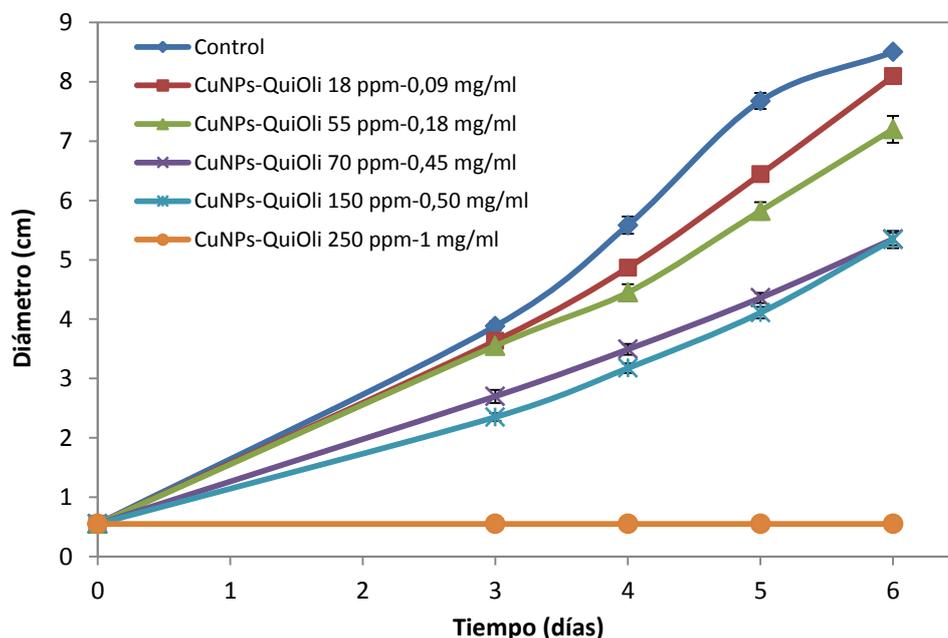


Figura 25. Curvas de crecimiento de *T. versicolor* para las distintas mezclas de nanopartículas de cobre y oligómeros de quitosano del ensayo con el método de dilución en agar. Cada punto representa la media de las tres réplicas y las barras de error indican su desviación estándar.

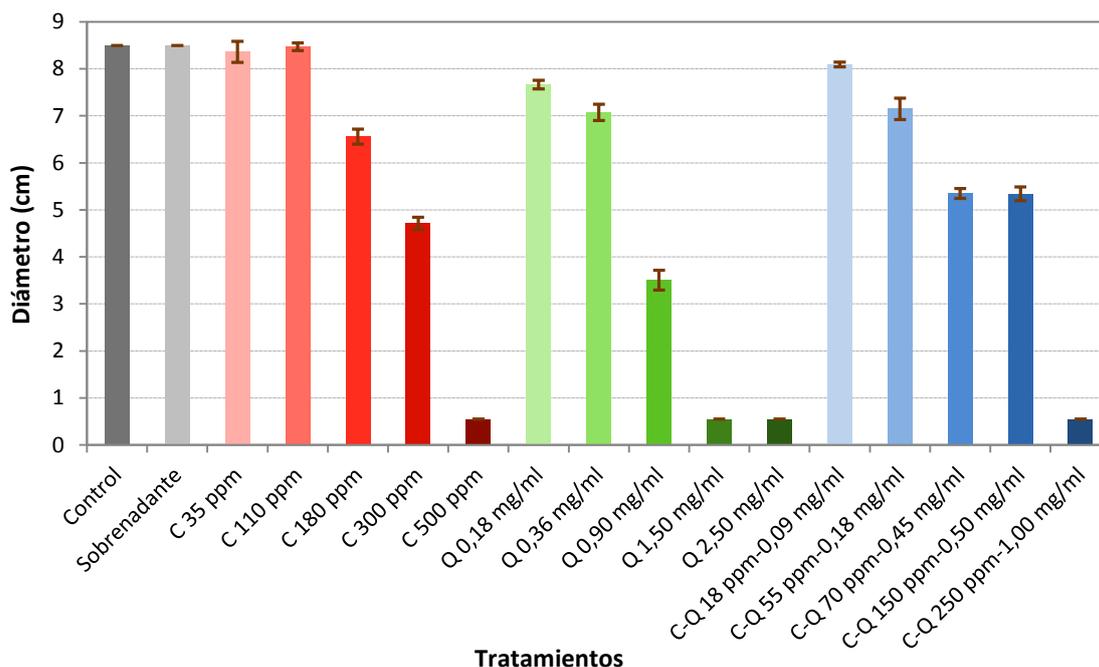


Figura 26. Diámetro medio alcanzado por los distintos tratamientos el sexto día del ensayo. Las barras de error indican la desviación estándar. C: CuNPs, Q: QuiOli, C-Q: CuNPs-QuiOli.

Tabla 9. Actividad antifúngica (porcentaje de reducción del crecimiento del hongo) y concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada tratamiento evaluado con el método de dilución en agar.

Compuesto	Concentración	Actividad antifúngica (día 6)	MIC
Sobrenadante	10 % volumen	0,00 %	-
CuNPs	35 ppm	1,67 %	500 ppm
	110 ppm	0,39 %	
	180 ppm	22,84 %	
	300 ppm	44,51 %	
	500 ppm	100,00 %	
QuiOli	0,18 mg/ml	9,80 %	1,50 mg/ml
	0,36 mg/ml	16,76 %	
	0,90 mg/ml	58,73 %	
	1,50 mg/ml	100,00 %	
	2,50 mg/ml	100,00 %	
CuNPs-QuiOli	18 ppm-0,09 mg/ml	4,80 %	250 ppm-1 mg/ml
	55 ppm-0,18 mg/ml	15,88 %	
	70 ppm-0,45 mg/ml	37,06 %	
	150 ppm-0,50 mg/ml	37,16 %	
	250 ppm-1 mg/ml	100,00 %	

En la Figura 27 puede observarse el aspecto de las placas Petri el último día del ensayo, con las dos concentraciones más efectivas por compuesto. Puede comprobarse cómo para todos los compuestos existe al menos una concentración que inhibe totalmente el crecimiento de *T. versicolor* (dos en el caso de los QuiOli).

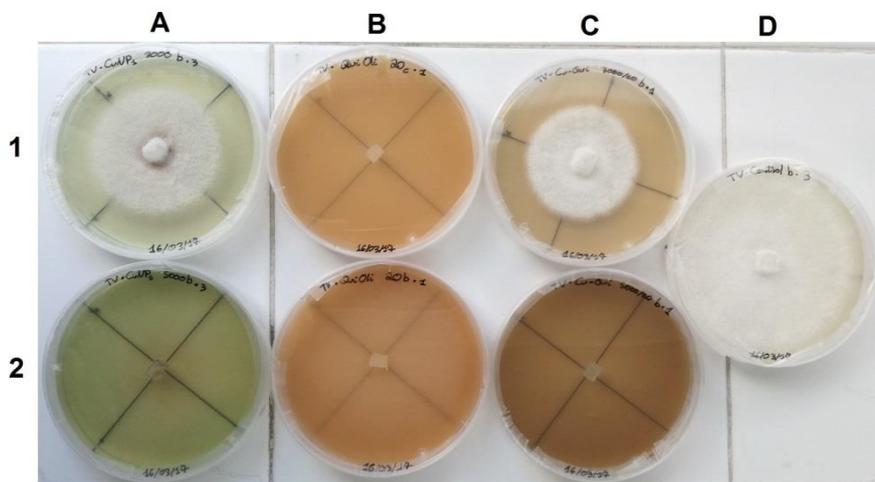


Figura 27. Aspecto de las placas Petri con las dos concentraciones más efectivas de cada compuesto, más el control, el sexto día del ensayo. A1: CuNPs 300 ppm, A2: CuNPs 500 ppm, B1: QuiOli 1,50 mg/ml, B2: QuiOli 2,50 mg/ml, C1: CuNPs-QuiOli 150 ppm-0,50 mg/ml, C2: CuNPs-QuiOli 250 ppm-1,00 mg/ml, D: Control.

5.2.1.2. Estadística comparativa: clasificación en grupos homogéneos y estudio de la sinergia

Debido a la acumulación de valores 0,55 cm y 8,5 cm en la serie de datos correspondiente al último día del ensayo, se decidió prescindir de ellos para llevar a cabo la clasificación de los distintos tratamientos en grupos homogéneos, ya que anulaban la necesaria normalidad de los datos y además es evidente que los tratamientos con dichos valores constituyen de por sí dos grupos claramente diferenciados y homogéneos (inhibición total del crecimiento y nulo efecto sobre el mismo, respectivamente). Los tratamientos de CuNPs a 35 ppm y 110 ppm, aunque no adquieren valores de 8,5 cm en los seis diámetros medidos, sí lo hacen en 4 y 5 de ellos respectivamente, situándose los restantes en cifras cercanas. Además, su desviación estándar permite el que sean integrados en el grupo de nulo efecto sobre el crecimiento, por lo que también fueron excluidos del análisis de grupos homogéneos.

La Figura 28 muestra el gráfico cuantil-cuantil (Q-Q plot) de los datos ya filtrados. Puede verse cómo a pesar del escaso número de los mismos (54 valores), su distribución a lo largo del eje de normalidad es aceptable, siendo esta conclusión respaldada por el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov (Tabla 10), cuyo valor-P mayor de 0,05 impide que se pueda rechazar la idea de que la serie de datos proviene de una distribución normal con un 95 % de confianza. Por lo tanto, los datos empleados cumplen la condición de normalidad.

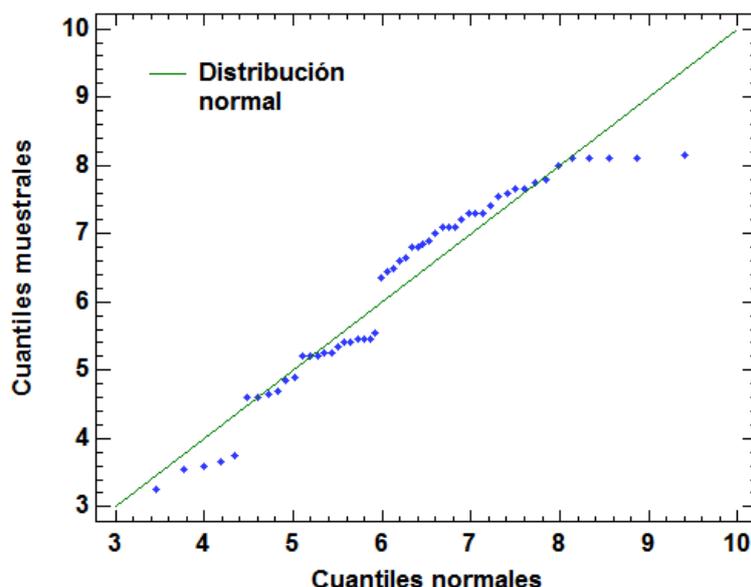


Figura 28. Gráfico cuantil-cuantil de los datos de diámetro medidos el sexto día del ensayo, excluyendo las placas sin crecimiento (0,55 cm) y las que llegaron al tope (8,5 cm).

Tabla 10. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para los datos de diámetro medidos el sexto día del ensayo, excluyendo las placas sin crecimiento (0,55 cm) y las que llegaron al tope (8,5 cm).

Parámetro	Valor
Dmas	0,114136
Dmenos	0,132896
Dn	0,132896
Valor-P	0,29741

Los resultados del análisis de la varianza con un solo factor (ANOVA one-way) mostrados en la Tabla 11 confirman que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los distintos tratamientos analizados (grupos en la tabla), pues su valor-P es menor de 0,05. Por lo tanto tiene sentido la realización de una prueba de rango múltiple para discernir cuáles son estos tratamientos estadísticamente diferentes y cuáles pueden englobarse dentro de grupos homogéneos.

Tabla 11. Parámetros del ANOVA one-way efectuado con los datos de diámetro medidos el sexto día del ensayo, excluyendo las placas sin crecimiento (0,55 cm) y las que llegaron al tope (8,5 cm).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	110,506	8	13,8132	589,89	0,0000
Intra grupos	1,05375	45	0,0234167		
Total (Corr.)	111,56	53			

Antes de ello, se precisa comprobar que los residuos del ANOVA siguen una distribución normal, tienen media cero y su varianza es homogénea. La Figura 29 muestra el gráfico cuantil-cuantil de los mismos, pudiéndose observar que se ajustan

de una forma clara a una distribución normal. También la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Tabla 12) confirma su normalidad con un 95 % de confianza (valor-P mayor de 0,05). Asimismo su media es muy próxima a 0, y la prueba de Bartlett corrobora que la varianza es homogénea, al dar un valor-P mayor de 0,05 (Tabla 12).

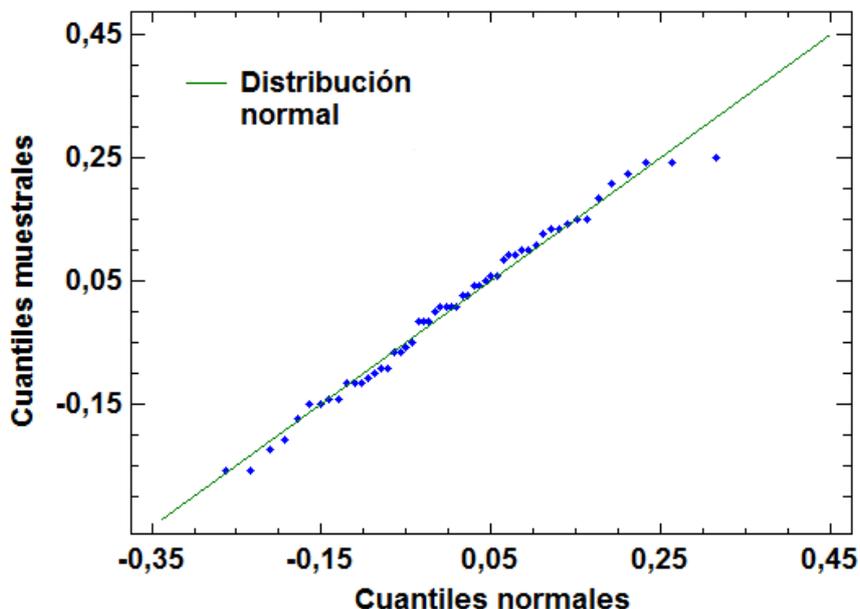


Figura 29. Gráfico cuantil-cuantil de los residuos del ANOVA one-way efectuado con los datos de diámetro medidos el sexto día del ensayo, excluyendo las placas sin crecimiento (0,45 cm) y las que llegaron al tope (8,5 cm).

Tabla 12. Análisis de los residuos asociados al ANOVA one-way efectuado con los datos de diámetro medidos el sexto día del ensayo, excluyendo las placas sin crecimiento (0,45 cm) y las que llegaron al tope (8,5 cm).

Prueba de Kolmogorov-Smirnov		Media	Prueba de Bartlett	
Parámetro	Valor	Valor	Estadístico	Valor-P
DMAS	0,0570026	$-2,18519 \times 10^{-8}$	12,6156	0,12578
DMENOS	0,064063			
DN	0,064063			
Valor-P	0,979645			

La prueba de rango múltiple efectuada mediante el método HSD de Tukey, con un nivel de confianza del 95 %, clasifica los nueve tratamientos analizados en siete grupos homogéneos (Tabla 13). Las mezclas de CuNPs-QuiOli con concentraciones de 70 ppm-0,45 mg/ml y 150 ppm-0,50 mg/ml respectivamente, quedan asignadas a un mismo grupo. Esto se debe probablemente a la similar concentración de oligómeros de quitosano que contienen, cuyo peso en la acción inhibitoria parece ser mayor que el de las CuNPs a dichas concentraciones. También tienen un efecto similar sobre el crecimiento del hongo los tratamientos de QuiOli 0,36 mg/ml y CuNPs-QuiOli 55 ppm-0,18 mg/ml, si bien su actividad antifúngica es escasa, en torno al 16 % (Tabla 9).

De manera independiente a la prueba de rango múltiple se han asignado a un mismo grupo aquellos tratamientos cuya actividad antifúngica es del 100 % (CuNPs 500 ppm, QuiOli 1,50 mg/ml y 2,50 mg/ml y CuNPs-QuiOli 250 ppm-1 mg/ml). También se han incluido en otro grupo aquellos tratamientos en los que la actividad antifúngica es del 0 % (sobrenadante y control), o bien su media y la desviación estándar asociada a ella permiten concluir que no se diferencian significativamente de ellos (CuNPs 35 ppm y 110 ppm), como ya se ha apuntado anteriormente.

Así pues, el total de grupos homogéneos originados para los diecisiete tratamientos evaluados es de nueve (Tabla 13). La Figura 30 muestra el gráfico de medias, asociadas a sus intervalos de confianza Tukey HSD del 95 %, de los tratamientos analizados con la prueba de rango múltiple. En él puede observarse gráficamente la asignación de grupos efectuada anteriormente, perteneciendo a uno de ellos aquellos tratamientos cuyos intervalos de confianza se solapan verticalmente.

Tabla 13. Clasificación de los tratamientos en grupos homogéneos en cuanto a actividad antifúngica evaluada con el método de dilución en agar. La banda central resulta de la prueba de rango múltiple con el método HSD de Tukey y confianza del 95%, mientras que las extremas son las asignadas de manera independiente. Los datos de diámetro se refieren al momento de finalización del ensayo (sexto día).

Tratamiento	Casos	Media del diámetro	Grupos homogéneos
CuNPs 500 ppm	6	0,550	X
QuiOli 1,50 mg/ml	6	0,550	X
QuiOli 2,50 mg/ml	6	0,550	X
CuNPs-QuiOli 250 ppm-1 mg/ml	6	0,550	X
QuiOli 0,90 mg/ml	6	3,508	X
CuNPs 300 ppm	6	4,717	X
CuNPs-QuiOli 150 ppm-0,50 mg/ml	6	5,342	X
CuNPs-QuiOli 70 ppm-0,45 mg/ml	6	5,350	X
CuNPs 180 ppm	6	6,558	X
QuiOli 0,36 mg/ml	6	7,075	X
CuNPs-QuiOli 55 ppm-0,18 mg/ml	6	7,150	X
QuiOli 0,18 mg/ml	6	7,667	X
CuNPs-QuiOli 18 ppm-0,09 mg/ml	6	8,092	X
CuNPs 35 ppm	6	8,358	X
CuNPs 110 ppm	6	8,467	X
Sobrenadante	6	8,500	X
Control	6	8,500	X

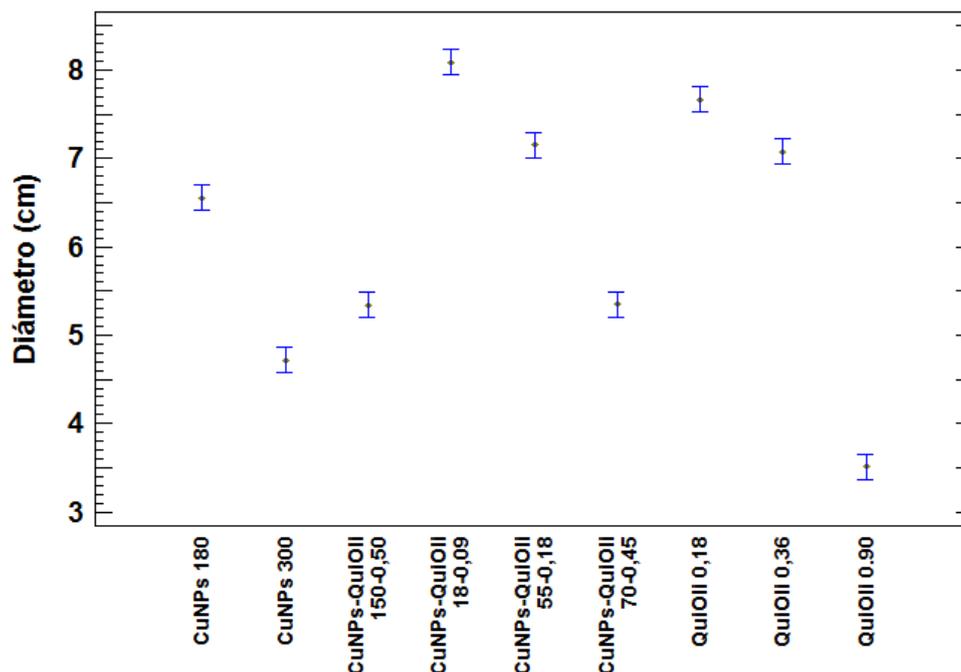


Figura 30. Gráfico de medias con intervalos de confianza Tukey HSD del 95 % para los tratamientos analizados mediante la prueba de rango múltiple. Los datos de diámetro se refieren al momento de finalización del ensayo (sexto día) con el método de dilución en agar.

Las Figuras 31 y 32 representan las regresiones lineales mínimo cuadráticas ajustadas con el fin de poder estudiar seguidamente el posible efecto sinérgico entre las nanopartículas de cobre y los oligómeros de quitosano. Las ecuaciones de los respectivos modelos ajustados para las CuNPs y los QuiOli se muestran debajo de ellas.

Para ajustar las regresiones se han utilizado los conjuntos de datos correspondientes a todas las concentraciones evaluadas con la excepción de una de las mismas por compuesto. En el caso de las CuNPs, la concentración excluida fue la de 35 ppm, por carecer de significación al tener el mismo efecto inhibitorio que la de 110 ppm que la precede (ninguno), siendo su inclusión en la regresión un agente que alteraría la relación lineal existente, puesto que sus valores de diámetro se ven limitados por la barrera física de 8,5 cm marcada por la placa Petri. En el caso de los QuiOli, la concentración excluida fue la de 2,50 mg/ml, por razones similares aunque inversas a las de las CuNPs, pues en este caso el efecto de alteración que ejercería sobre la regresión se debe a la imposibilidad de adquirir valores de diámetro inferiores a 0,55 cm, que ya han sido alcanzados por la concentración anterior de 1,50 mg/ml.

En la Tabla 14 puede comprobarse cómo en ambas regresiones (CuNPs y QuiOli) los valores tomados por el coeficiente de correlación de Pearson se encuentran muy próximos a la unidad, lo que es indicativo de una fuerte relación lineal entre las concentraciones evaluadas y los valores de diámetro obtenidos. También se observa que los coeficientes de determinación (R^2) adquieren valores superiores al 99 % en los dos casos, indicando este hecho que la varianza explicada por los modelos es muy

elevada en ambos. Por lo tanto, puede concluirse que las dos regresiones efectuadas tienen gran validez estadística.

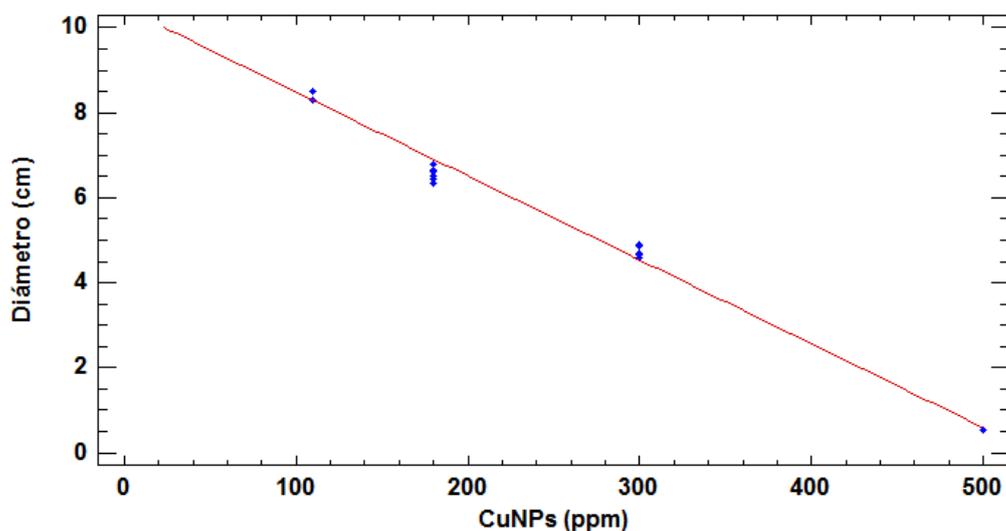


Figura 31. Regresión lineal mínimo cuadrática ajustada para las nanopartículas de cobre.

Ecuación del modelo ajustado: $\text{Diámetro (cm)} = 10,4548 - 0,0197502 \times \text{CuNPs (ppm)}$

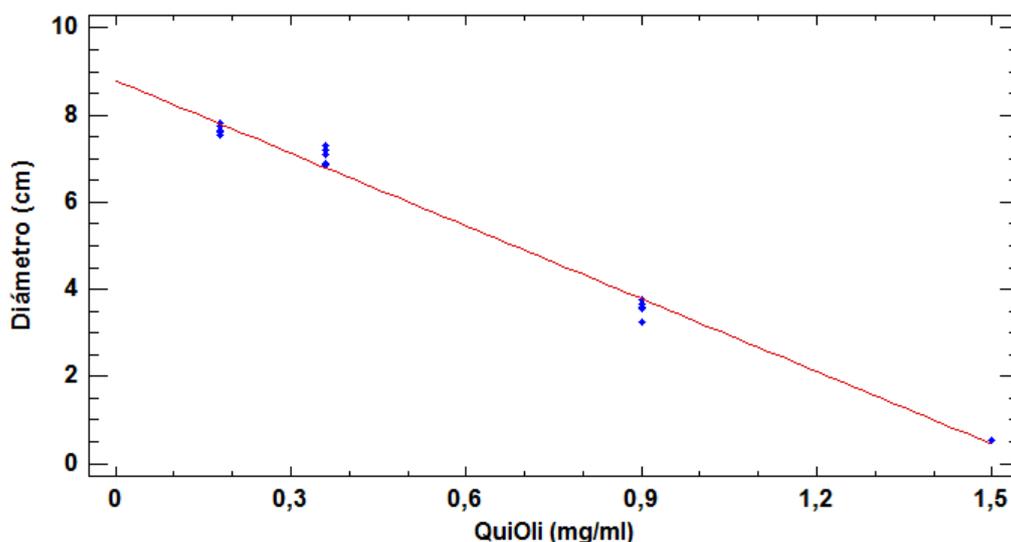


Figura 32. Regresión lineal mínimo cuadrática ajustada para los oligómeros de quitosano.

Ecuación del modelo ajustado: $\text{Diámetro (cm)} = 8,79268 - 5,56828 \times \text{QuiOli (mg/ml)}$

Tabla 14. Principales parámetros de las dos regresiones mínimo cuadráticas efectuadas.

Regresión	Coefficiente de correlación de Pearson	Coefficiente de determinación (R ²)	Error estándar del estimado	Error absoluto medio
CuNPs	-0,99669	99,3391 %	0,248828	0,185614
QuiOli	-0,996175	99,2364 %	0,262762	0,199115

En la Tabla 15 quedan reflejados los valores tomados por el diámetro, tanto para las CuNPs como para los QuiOli, tras realizar las respectivas predicciones directas mediante las dos ecuaciones de los modelos ajustados, así como los obtenidos tras sumar o restar a estas el valor del error estándar del estimado que corresponda.

Tabla 15. Predicción a partir de las regresiones lineales de los valores del diámetro para las concentraciones de CuNPs y QuiOli seleccionados.

Tratamiento	Diámetro (cm)	Límites de predicción
CuNPs 150 ppm	7,243442	- 0,248828
CuNPs 150 ppm	7,49227	Predicho
CuNPs 150 ppm	7,741098	+ 0,248828
QuiOli 0,50 mg/ml	5,745778	- 0,262762
QuiOli 0,50 mg/ml	6,00854	Predicho
QuiOli 0,50 mg/ml	6,271302	+ 0,262762

Los datos definitivos empleados para la determinación del posible efecto sinérgico mediante el análisis de la varianza con dos factores (ANOVA two-way) se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Datos empleados en el ANOVA two-way para el análisis del posible efecto sinérgico entre las CuNps y los QuiOi.

Combinación	CuNPs	QuiOli	Diámetro (cm)
A	150 ppm	0 mg/ml	7,243442
	150 ppm	0 mg/ml	7,49227
	150 ppm	0 mg/ml	7,741098
B	0 ppm	0,50 mg/ml	5,745778
	0 ppm	0,50 mg/ml	6,00854
	0 ppm	0,50 mg/ml	6,271302
C	150 ppm	0,50 mg/ml	5,325
	150 ppm	0,50 mg/ml	5,50
	150 ppm	0,50 mg/ml	5,20
D	0 ppm	0 mg/ml	8,50
	0 ppm	0 mg/ml	8,50
	0 ppm	0 mg/ml	8,50

La Tabla 17 muestra los resultados del análisis de la varianza con dos factores efectuado. El parámetro que indica el posible efecto sinérgico entre las nanopartículas de cobre (factor A) y los oligómeros de quitosano (factor B) es la interacción AB. Debido a que el valor-P asociado a dicho parámetro es superior a 0,05 puede afirmarse que no existe efecto sinérgico entre ambos compuestos, y que por lo tanto su relación es aditiva, y no multiplicativa. Es decir, puede concluirse que la combinación de nanopartículas de cobre y oligómeros de quitosano mediante la sonicación de sus disoluciones no originan un compuesto binario con propiedades antifúngicas frente a *T. versicolor* superiores a la suma de los efectos de ambas por

separado. Esta relación aditiva puede advertirse claramente en el paralelismo guardado por las líneas representadas en el gráfico de interacción entre las CuNPs y los QuiOli (Figura 33). Estas líneas unen dos a dos las medias de los cuatro tratamientos analizados. En el caso de que no fueran paralelas de un modo estadísticamente significativo podría hablarse de efecto sinérgico, mayor cuanto más divergentes se mostrasen.

Tabla 17. Valores tomados por los parámetros del ANOVA two-way efectuado para analizar el posible efecto sinérgico entre las CuNPs y los QuiOli.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:CuNPs	2,10322	1	2,10322	54,75	0,0001
B:QuiOli	16,1616	1	16,1616	420,69	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,0871375	1	0,0871375	2,27	0,1705
RESIDUOS	0,307335	8	0,0384169		
TOTAL (CORREGIDO)	18,6593	11			

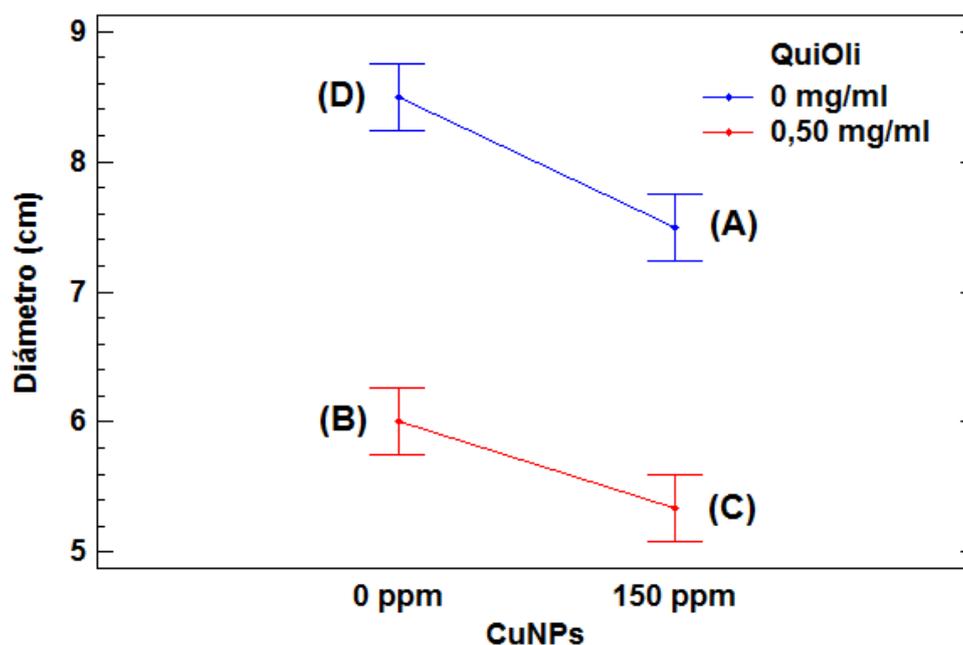


Figura 33. Gráfico de interacción entre las CuNPs y los QuiOli procedente del ANOVA two-way, con intervalos Tukey HSD del 95 % de confianza. Tratamientos: (A) solo CuNPs; (B) solo QuiOli; (C) mezcla binaria; (D) control.

Los gráficos de medias representados en las Figuras 34 y 35 muestran los valores medios de diámetro tomados por las CuNPs y los QuiOli teniendo en cuenta las dos concentraciones estudiadas de cada uno, y promediando sus resultados cuando actúan aisladamente y en combinación con el otro compuesto. Puede observarse cómo a las concentraciones estudiadas los QuiOli tienen un efecto mayor sobre el

crecimiento del hongo que las CuNPs, al ser menor la media del diámetro resultante cuando están actuando.

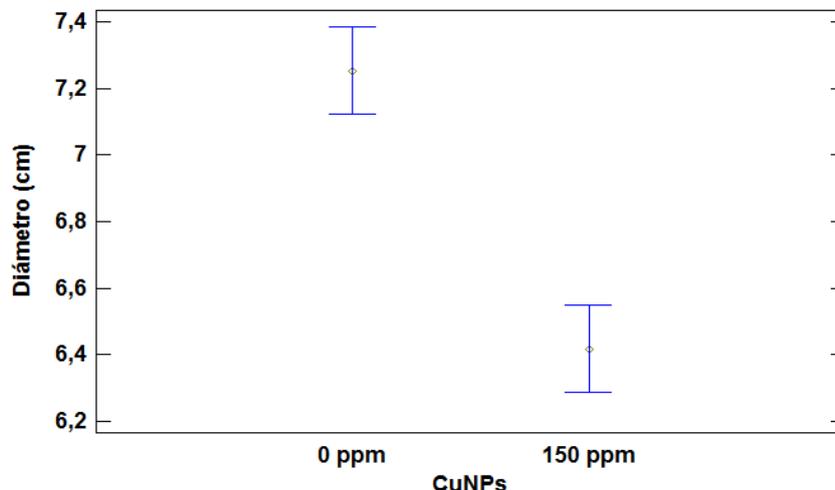


Figura 34. Gráfico de medias con intervalos Tukey HSD del 95 % de confianza para las dos concentraciones de nanopartículas de cobre evaluadas en el ANOVA two-way.

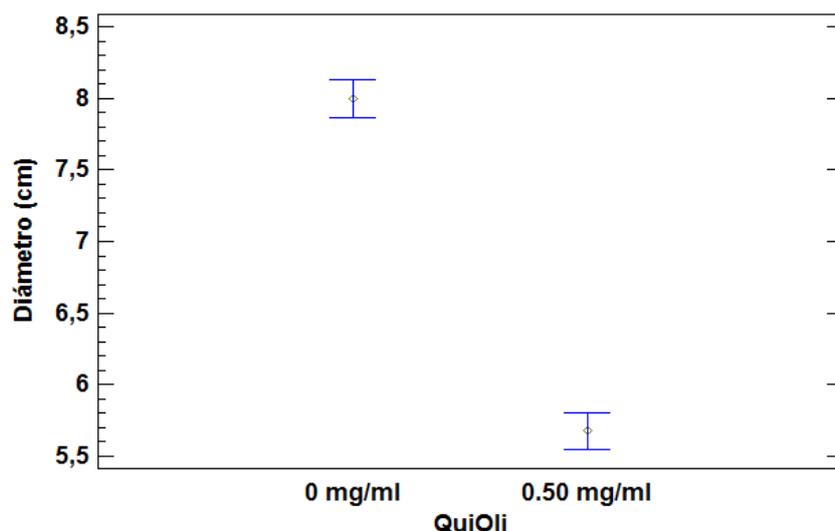


Figura 35. Gráfico de medias con intervalos Tukey HSD del 95 % de confianza para las dos concentraciones de oligómeros de quitosano evaluadas en el ANOVA two-way.

Para validar el análisis de la varianza llevado a cabo se ha comprobado que sus residuos asociados siguen una distribución normal, que su media es próxima a cero y que su varianza es homogénea (Tabla 18 y Figura 36). La prueba de Kolmogorov-Smirnov confirma la normalidad de los residuos (valor-P > 0,05), la media se halla muy próxima a 0 y el gráfico de residuos-predichos, pese a la escasez de datos, no muestra tendencia alguna.

Tabla 18. Análisis de los residuos asociados al ANOVA two-way empleado para el análisis de sinergia.

Prueba de Kolmogorov-Smirnov		Media
Parámetro	Valor	Valor
DMAS	0,249997	$-5,83333 \times 10^{-8}$
DMENOS	0,210285	
DN	0,249997	
Valor-P	0,448754	

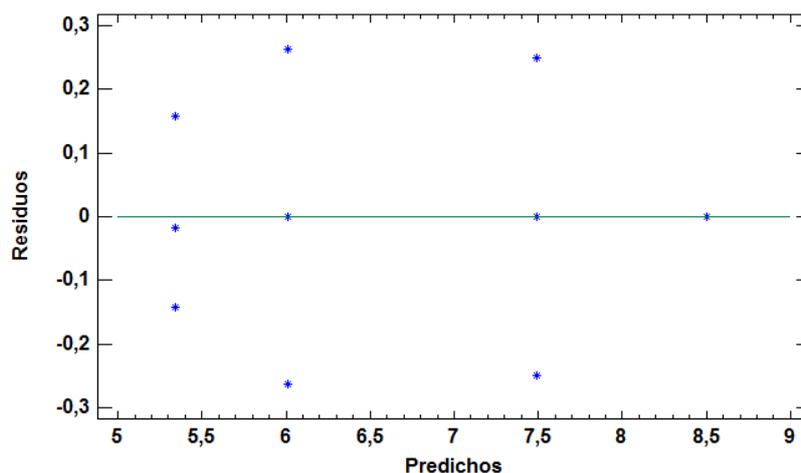


Figura 36. Gráfico de residuos vs. predichos del ANOVA two-way empleado para el análisis de sinergia.

5.2.1.3. Evaluación cualitativa

En la Figura 37 puede observarse el efecto causado por los distintos compuestos sobre el desarrollo del micelio. Se aprecia cómo las CuNPs producen un daño más exhaustivo en el interior del mismo, ocasionando un ahuecamiento continuo y homogéneo sobre toda su superficie, mientras que los QuiOli se limitan a contener su crecimiento. La mezcla binaria presenta un aspecto similar al de los QuiOli, si bien con cierta porosidad que recuerda a la de las CuNPs, aunque de menor densidad.

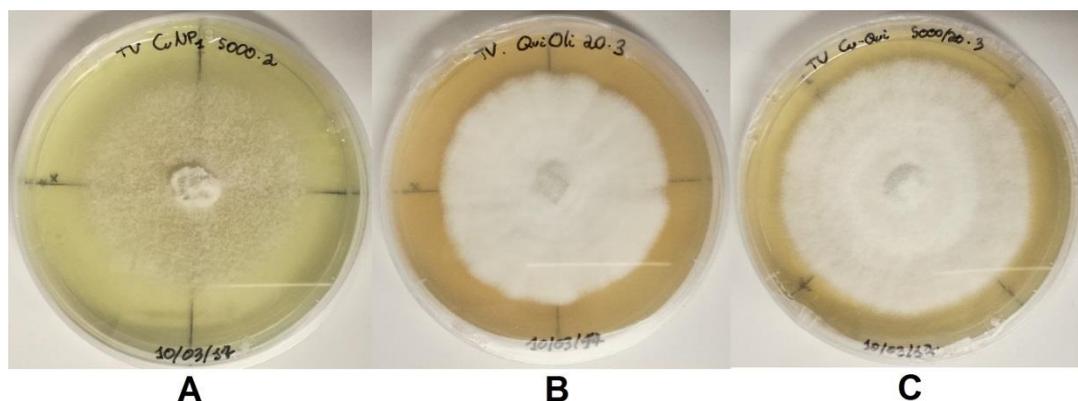


Figura 37. Aspecto del micelio de *T. versicolor* tras su exposición a los distintos compuestos evaluados a los 8 días de iniciarse el ensayo. A: CuNPs 180 ppm, B: QuiOli 0,90 mg/ml, C: CuNPs-QuiOli 70 ppm-0,45 mg/ml.

5.2.1.4. Discusión de los resultados obtenidos

Para las nanopartículas de cobre, los resultados obtenidos concuerdan considerablemente con los alcanzados por Viet et al. (2016) con *Fusarium sp.* En su caso, obtuvieron un 93,98 % de inhibición del crecimiento con una concentración de CuNPs de 450 ppm (tamaño de 20-50 nm) el día en que el tratamiento control llegó al límite de la placa. Además, dicho crecimiento se dio en los tres primeros días del ensayo, inhibiéndose completamente los restantes, por lo que podría considerarse como muy próxima a la MIC, de manera análoga a la obtenida en el presente estudio con una concentración de 500 ppm. Para la concentración de 300 ppm, Viet et al. (2016) obtienen un 45-50 % de inhibición, siendo de 44,51 % en nuestro caso, es decir, un resultado muy semejante.

(Ghasemian, Naghoni, Tabaraie, & Tabaraie, 2012) evaluaron el poder antifúngico de nanopartículas de cobre con un tamaño medio de 8 nm frente a los hongos filamentosos *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium solani* y *Penicillium chrysogenum*, obteniendo como MICs (mediante el método de dilución en agar) 60 mg/l (60 ppm), 80 mg/l (80 ppm), 60 mg/l (60 ppm) y 40 mg/l (40 ppm), respectivamente. Las menores concentraciones requeridas para inhibir totalmente el crecimiento, en comparación con nuestro estudio, es muy probable que se deban en gran medida al menor tamaño de las CuNPs, lo que las hace más nocivas, sin olvidar la importancia que juega la especie de hongo testada. De igual manera, Van Cao et al. (2014) obtienen aún menores concentraciones inhibitorias (7 ppm como MIC, 95 % de inhibición con 5 ppm y 90 % con 3 ppm) frente a *Corticium salmonicolor*, siendo el tamaño de las CuNPs de 2-5 nm.

Para los oligómeros de quitosano, Castro Silva (2015) obtiene, siguiendo el mismo método de síntesis, una concentración 100 % inhibitoria (MIC) frente a *T. versicolor* de 5 mg/ml, siendo la obtenida en este estudio de 1,50 mg/ml, si bien en su caso la siguiente concentración testada fue de 2 mg/ml, con la que obtuvo más del 95 % de inhibición, por lo que los resultados son lo suficientemente concordantes.

Un estudio realizado con nanopartículas de quitosano (Saharan et al., 2013) ha arrojado resultados de 80,1 % de inhibición frente a *A. alternata* con 0,6 mg/ml (0,06 % w/v) y 84 % frente a *Macrophomina phaseolina* con 0,1 mg/ml (0,01 % w/v). Estas cifras de inhibición son menores que las obtenidas en el presente estudio, si bien hay que tener en cuenta la diferencia cualitativa del compuesto evaluado (nanopartículas de quitosano frente a oligómeros de quitosano) y los diferentes hongos testados.

En cuanto a mezclas binarias de quitosano y cobre, son varios los estudios realizados respecto a su efecto inhibitorio sobre diversos microorganismos, tanto para CuNPs recubiertas con películas de quitosano como para nanopartículas de quitosano con iones Cu^{2+} adheridos a su estructura interna. No obstante, en ambos casos las comparaciones con los resultados obtenidos en este estudio son difícilmente realizables, pues no solo el compuesto evaluado es significativamente diferente, sino que en muchos casos también lo son los métodos de evaluación y los organismos testados.

A modo de ejemplo para el primer caso, Tantubay et al. (2015) sintetizan y evalúan nanopartículas de cobre de 4-15 nm de diámetro recubiertas por una capa de 2 nm de quitosano carboximetilado. Los organismos testados (mediante el método de difusión por pocillos en agar, "agar well diffusion method") son la levadura *Candida tropicalis* y la bacteria *Escherichia coli*, obteniendo inhibiciones del 100 % en ambos organismos con concentraciones de 3,9 ppm (3,9 µg/mL). Sus resultados, aunque no extrapolables a los obtenidos en el presente estudio, resultan interesantes para comprobar cómo las CuNPs incrementan su poder antimicrobiano al ser recubiertas con quitosano.

Para el caso de las nanopartículas de quitosano con iones de cobre quelados en su estructura interna, Saharan et al. (2015) las sintetizan con un tamaño de 150 nm y las evalúan frente a los hongos *Alternaria solani* y *Fusarium oxysporum*, obteniendo inhibiciones de en torno al 70 % con una concentración de 0,12 % w/v (1200 ppm), Estas inhibiciones son significativamente superiores a las obtenidas a las mismas concentraciones con las nanopartículas de quitosano sin quelar, así como con los iones de Cu actuando independientemente, aduciendo los autores a un posible efecto sinérgico entre ambos compuestos que en el caso de nuestra mezcla binaria no ha podido ser demostrado.

Los resultados obtenidos de la evaluación cualitativa sugieren una acción más persistente sobre el micelio del hongo por parte de las CuNPs respecto a los QuiOli, ya que producen un mayor deterioro del mismo, ahuecándolo en toda su superficie. Sin embargo, en nuestro caso este hecho no implica un mayor freno a su expansión diametral, como puede comprobarse comparando los resultados de crecimiento obtenidos.

Las razones de este comportamiento nos son desconocidas y emplazamos a nuevos estudios a que investiguen el fenómeno. No obstante, se sugiere la posibilidad de que las nanopartículas metálicas, una vez que han causado su efecto dañino sobre la célula del organismo atacado, quedan de nuevo liberadas al medio conservando su potencial capacidad antimicrobiana, mientras que los oligómeros de quitosano se mantienen adheridos a las estructuras celulares a causa de los enlaces más estables generados por el grupo amino, no pudiendo atacar más células del organismo a eliminar y, por lo tanto, permitiendo la persistencia del mismo en el medio.

5.2.2. Evaluación en madera de *Populus sp.* impregnada con los compuestos

La evaluación de la actividad antifúngica de los compuestos, transferidos a las probetas de madera por un tratamiento de inmersión, y obtenida a través de la medición de la pérdida de peso de estas, permite mostrar gráficamente su evolución temporal por tratamiento, así como establecer tres grupos homogéneos de tratamientos diferenciados de una manera estadísticamente significativa.

5.2.2.1. Estadística descriptiva

En las Tablas 19, 20, 21 y 22 se muestran los valores de los principales parámetros estadísticos (promedio, mínimo, máximo, desviación estándar y coeficiente de variación) de los datos de pérdida de peso, expresado en porcentaje, por cada tratamiento y día de medida.

Tabla 19. Principales parámetros estadísticos descriptivos relativos a la pérdida de peso (en porcentaje) experimentada por las probetas de madera según el tipo de tratamiento en el día 15 del ensayo.

Tratamiento	Casos	Promedio (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)	Desviación estándar	Coeficiente de Variación
Control	5	-1,508	-1,971	-1,352	0,261	-17,306 %
CuNPs 500 ppm	5	-1,062	-1,251	-0,582	0,284	-26,763 %
CuNPs 2000 ppm	5	-0,999	-1,969	-0,428	0,576	-57,670 %
QuiOli 1,5 mg/ml	5	4,936	2,874	8,743	2,545	51,569 %
QuiOli 6 mg/ml	5	0,783	-0,632	1,730	0,980	125,178 %
CuNPs-QuiOli 250 ppm-1 mg/ml	5	-0,302	-0,558	-0,046	0,188	-62,129 %
CuNPs-QuiOli 1000 ppm-4 mg/ml	5	8,037	3,495	12,865	4,219	52,496 %

Tabla 20. Principales parámetros estadísticos descriptivos relativos a la pérdida de peso (en porcentaje) experimentada por las probetas de madera según el tipo de tratamiento en el día 25 del ensayo.

Tratamiento	Casos	Promedio (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)	Desviación estándar	Coeficiente de Variación
Control	5	12,737	7,561	16,100	3,429	26,923 %
CuNPs 500 ppm	5	19,500	12,183	24,602	5,648	28,964 %
CuNPs 2000 ppm	5	12,878	2,312	24,758	9,490	73,698 %
QuiOli 1,5 mg/ml	5	32,242	28,402	35,474	2,911	9,029 %
QuiOli 6 mg/ml	5	35,562	30,819	40,175	3,737	10,509 %
CuNPs-QuiOli 250 ppm-1 mg/ml	5	11,477	7,838	20,558	5,301	46,184 %
CuNPs-QuiOli 1000 ppm-4 mg/ml	5	16,475	7,911	21,540	5,444	33,046 %

Tabla 21. Principales parámetros estadísticos descriptivos relativos a la pérdida de peso (en porcentaje) experimentada por las probetas de madera según el tipo de tratamiento en el día 35 del ensayo.

Tratamiento	Casos	Promedio (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)	Desviación estándar	Coefficiente de Variación
Control	5	36,751	28,992	42,887	5,648	15,368 %
CuNPs 500 ppm	5	13,234	10,085	16,347	2,781	21,015 %
CuNPs 2000 ppm	5	17,544	4,596	25,892	9,502	54,159 %
QuiOli 1,5 mg/ml	5	45,311	40,555	46,784	2,670	5,893 %
QuiOli 6 mg/ml	5	47,182	40,816	50,956	3,942	8,356 %
CuNPs-QuiOli 250 ppm-1 mg/ml	5	26,874	17,412	32,944	6,545	24,354 %
CuNPs-QuiOli 1000 ppm-4 mg/ml	5	30,092	21,063	39,878	7,338	24,385 %

Tabla 22. Principales parámetros estadísticos descriptivos relativos a la pérdida de peso (en porcentaje) experimentada por las probetas de madera según el tipo de tratamiento en el día 45 del ensayo.

Tratamiento	Casos	Promedio (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)	Desviación estándar	Coefficiente de Variación
Control	5	43,397	40,658	46,071	2,210	5,093 %
CuNPs 500 ppm	5	5,042	2,905	7,431	1,897	37,625 %
CuNPs 2000 ppm	5	3,209	1,406	5,026	1,514	47,182 %
QuiOli 1,5 mg/ml	5	41,447	38,778	46,160	2,810	6,779 %
QuiOli 6 mg/ml	5	46,499	41,728	49,228	2,902	6,242 %
CuNPs-QuiOli 250 ppm-1 mg/ml	5	41,875	34,319	50,154	6,641	15,860 %
CuNPs-QuiOli 1000 ppm-4 mg/ml	5	16,135	8,989	20,666	4,714	29,219 %

La Figura 38 muestra el gráfico de evolución temporal de la pérdida de peso de las probetas por tratamiento, elaborado a partir de los promedios obtenidos anteriormente y sus desviaciones estándar asociadas.

Las diferencias obtenidas en cuanto a la acción de cada tipo de compuesto son realmente elevadas, si bien dentro de cada uno de ellos no existen diferencias notables entre las concentraciones empleadas (asunto estudiado en la estadística comparativa), salvo en el caso de la mezcla binaria. Así, los tratamientos con CuNPs arrojan pérdidas de peso medias para el último día entre el 3,2 % (2000 ppm) y el 5 % (500 ppm), mientras que los QuiOli se sitúan en valores entre el 41,4 % (1,5 mg/ml) y el 46,5 % (6 mg/ml). La mezcla binaria de 1000 ppm-4 mg/ml arroja un resultado del 16,1 %, mientras que la de 250 ppm-1 mg/ml lo hace del 42,3 %, valor cercano al del tratamiento control (43,4 %) y a los de QuiOli.

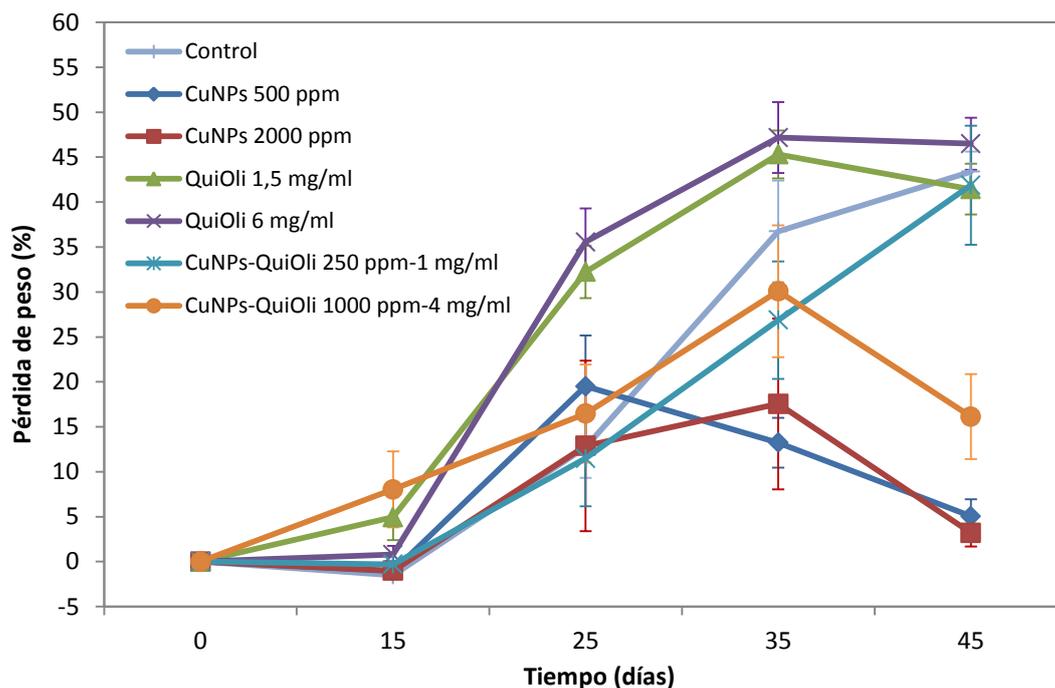


Figura 38. Evolución temporal de la pérdida de peso experimentada por las probetas de madera según el tipo de tratamiento. Los puntos indican el promedio y las barras de error la desviación estándar.

5.2.2.2. Estadística comparativa: clasificación en grupos homogéneos

En la Figura 38 puede advertirse cómo en el día 45 los tratamientos parecen separarse en dos grupos bien diferenciados (CuNPs 500 ppm, CuNPs 2000 ppm y CuNPs-QuiOli 1000 ppm-4 mg/ml por un lado, y el resto por el otro), observación que se confirma con el análisis del histograma formado a partir de todos los datos correspondientes a dicho día (Figura 39). Este hecho representa un obstáculo a la hora de realizar la estadística comparativa, pues viola la hipótesis necesaria de normalidad de los datos. Para solucionarlo, se decidió segregar los datos en dos grupos diferenciados (Tabla 23) y analizar cada uno de ellos por separado.

Tabla 23. Grupos de tratamientos formados a partir del análisis y la segregación de los datos relativos al día 45 del ensayo.

Grupo 1	Grupo 2
CuNPs 500 ppm	Control
CuNPs 2000 ppm	QuiOli 1,5 mg/ml
CuNPs-QuiOli 1000 ppm-4 mg/ml	QuiOli 6 mg/ml
	CuNPs-QuiOli 250 ppm-1 mg/ml

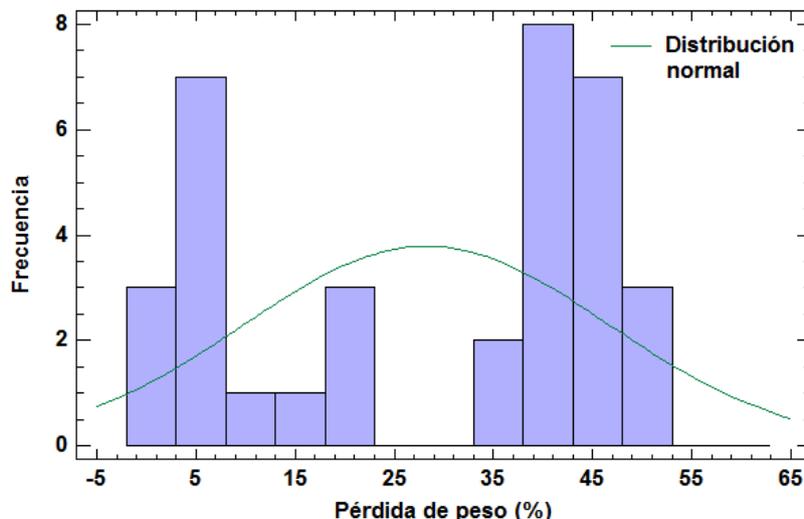


Figura 39. Histograma formado a partir de los datos de pérdida de peso relativos a las probetas de madera de todos los tratamientos correspondientes al día 45 del ensayo.

Los dos grupos de datos segregados deben cumplir la hipótesis de normalidad para poder llevar a cabo los análisis estadísticos comparativos. Con tal fin se realizó una transformación de variable consistente en la aplicación de la función logaritmo neperiano a los datos de pérdida de peso (expresados en porcentaje) de ambos grupos.

La Figura 40 muestra el gráfico cuantil-cuantil de los datos (ya transformados) del grupo 1. Puede observarse que se ajustan notablemente a la distribución normal, lo que es confirmado en la Tabla 24 por los valores-P de las dos pruebas de normalidad efectuadas, que en ambos casos superan el valor 0,05 necesario.

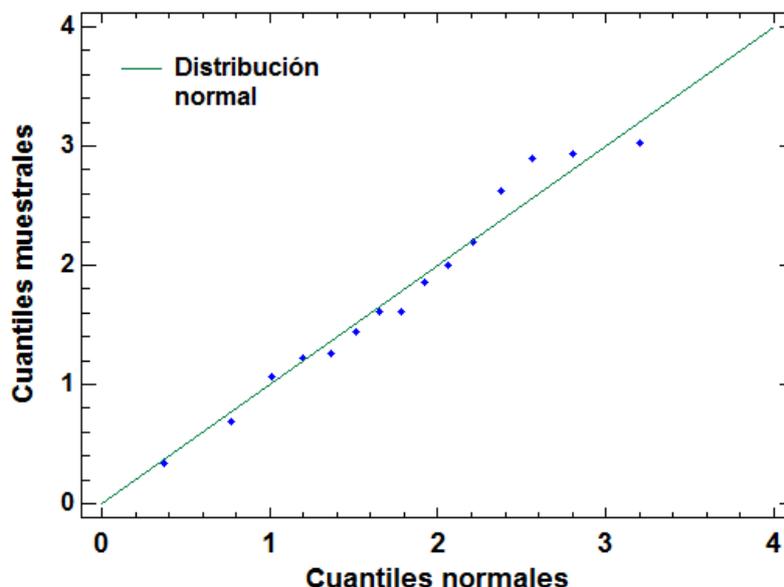


Figura 40. Gráfico cuantil-cuantil formado a partir de los datos de pérdida de peso (transformados mediante ln) del grupo 1 de tratamientos.

Tabla 24. Pruebas de normalidad efectuadas a los datos de pérdida de peso (transformados mediante ln) del grupo 1 de tratamientos.

Prueba de Kolmogorov-Smirnov		Prueba de Shapiro-Wilk	
Parámetro	Valor	Estadístico W	Valor-P
DMAS	0,114992	0,958897	0,642362
DMENOS	0,111746		
DN	0,114992		
Valor-P	0,988802		

En el caso del grupo 2, el gráfico cuantil-cuantil (Figura 41) también ajusta relativamente bien a la distribución normal, siendo las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk (Tabla 25) definitivas para confirmar la distribución normal de los datos (valores-P superiores a 0,05 en ambos casos).

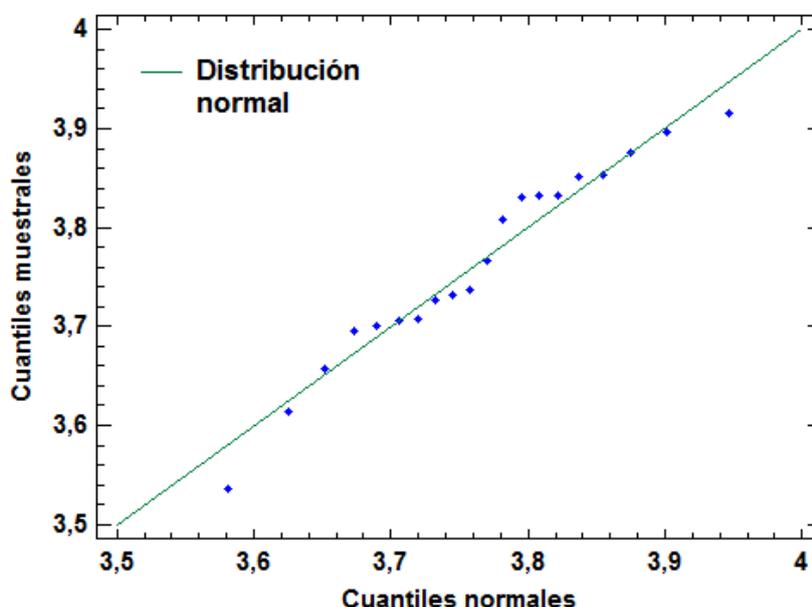


Figura 41. Gráfico cuantil-cuantil formado a partir de los datos de pérdida de peso (transformados mediante ln) del grupo 2 de tratamientos.

Tabla 25. Pruebas de normalidad efectuadas a los datos de pérdida de peso (transformados mediante ln) del grupo 2 de tratamientos.

Prueba de Kolmogorov-Smirnov		Prueba de Shapiro-Wilk	
Parámetro	Valor	Estadístico W	Valor-P
DMAS	0,104962	0,957763	0,507281
DMENOS	0,148057		
DN	0,148057		
Valor-P	0,772991		

Tras confirmar la normalidad de los datos de ambos grupos se procedió a realizar los análisis de la varianza con un solo factor (ANOVA one-way) correspondientes. Los resultados de la Tabla 26, relativos al grupo 1, confirman que existen diferencias

estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos (grupos) analizados (valor-P inferior a 0,05). El análisis de la normalidad de los residuos del ANOVA mediante el gráfico cuantil-cuantil (Figura 42) y la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Tabla 27), así como el de la media y el de la varianza mediante la prueba de Bartlett (ambas en la Tabla 27) validan el procedimiento.

Tabla 26. Parámetros del ANOVA one-way llevado a cabo con los datos de pérdida de peso (transformados mediante ln) del grupo 1 de tratamientos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7,43662	2	3,71831	20,08	0,0001
Intra grupos	2,22207	12	0,185173		
Total (Corr.)	9,65869	14			

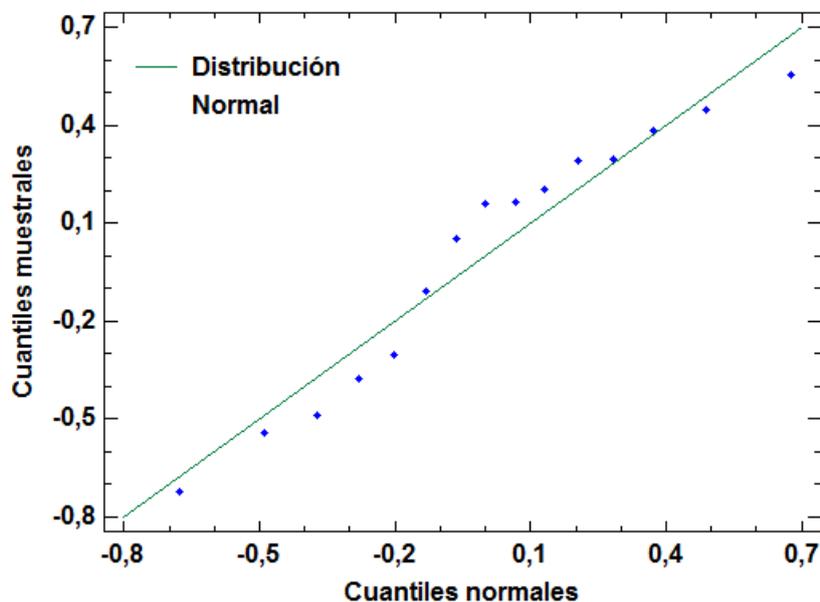


Figura 42. Gráfico cuantil-cuantil formado a partir de los residuos del ANOVA one-way llevado a cabo con los datos de pérdida de peso (transformados mediante ln) del grupo 1 de tratamientos.

Tabla 27. Análisis de los residuos asociados al ANOVA one-way efectuado con los datos de pérdida de peso (transformados mediante ln) del grupo 1 de tratamientos.

Prueba de Kolmogorov-Smirnov		Media	Prueba de Bartlett	
Parámetro	Valor	Valor	Estadístico	Valor-P
DMAS	0,109801	-2×10^{-8}	0,797966	0,671002
DMENOS	0,188022			
DN	0,188022			
Valor-P	0,663911			

En la Tabla 28 se muestran los resultados del ANOVA con un solo factor ejecutado a partir de los datos del grupo 2. Debido a que el valor-P resultante no es inferior a 0,05, puede afirmarse que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (grupos) analizados.

Tabla 28. Parámetros del ANOVA one-way llevado a cabo con los datos de pérdida de peso (transformados mediante ln) del grupo 2 de tratamientos.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0436794	3	0,0145598	1,61	0,2268
Intra grupos	0,144855	16	0,00905347		
Total (Corr.)	0,188535	19			

La normalidad de los residuos del ANOVA (Figura 43 y Tabla 29), su media próxima a 0 y la confirmación de la homogeneidad de la varianza (Tabla 29) validan el procedimiento llevado a cabo.

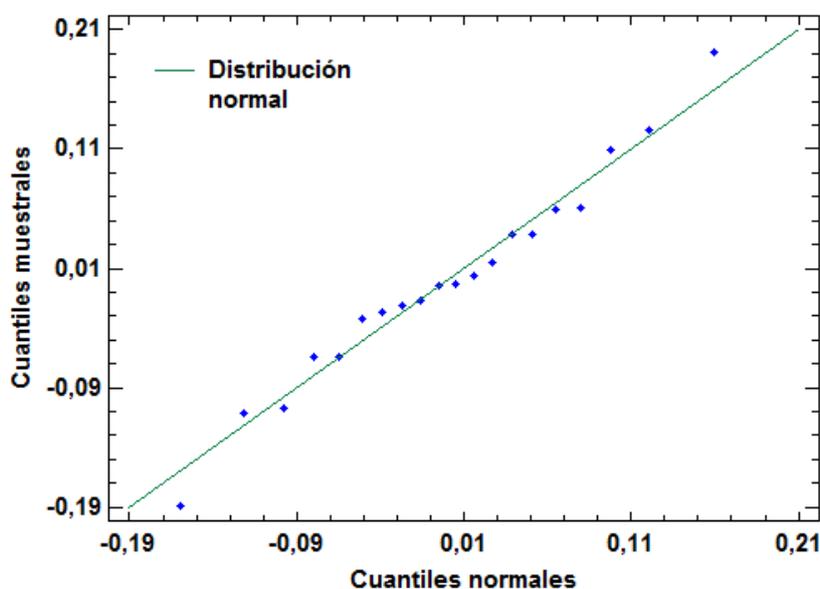


Figura 43. Gráfico cuantil-cuantil formado a partir de los residuos del ANOVA one-way llevado a cabo con los datos de pérdida de peso (transformados mediante ln) del grupo 2 de tratamientos.

Tabla 29. Análisis de los residuos asociados al ANOVA one-way efectuado con los datos de pérdida de peso (transformados mediante ln) del grupo 2 de tratamientos.

Prueba de Kolmogorov-Smirnov		Media	Prueba de Bartlett	
Parámetro	Valor	Valor	Estadístico	Valor-P
DMAS	0,0929685	$6,3 \times 10^{-8}$	6,32932	0,09664
DMENOS	0,105896			
DN	0,105896			
Valor-P	0,978384			

Tras la confirmación de la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos del primer grupo de datos, se llevó a cabo la prueba de rango múltiple mediante el método LSD de Fisher (95 % de confianza) con ellos, dando como resultado que el tratamiento CuNPs-QuiOli 1000 ppm-4 mg/ml se diferencia significativamente de los otros dos (CuNPs 500 ppm y CuNPs 2000 ppm). En la Tabla 30 se muestra la clasificación de los tratamientos llevada a cabo por la prueba de rango múltiple, junto con la clasificación de los tratamientos del segundo grupo diferenciados de los primeros e incluidos en un mismo grupo homogéneo, tal como demostró el ANOVA one-way efectuado con ellos. Por consiguiente, los siete tratamientos estudiados quedan definitivamente incluidos en los tres grupos homogéneos mostrados.

Tabla 30. Clasificación de los tratamientos en grupos homogéneos. La banda superior resulta de la prueba de rango múltiple efectuada con el método LSD de Fisher (confianza del 95%) sobre los datos del primer grupo de tratamientos, mientras que la inferior resulta de la asignación de los tratamientos del segundo grupo a partir del ANOVA one-way.

Tratamiento	Casos	Promedio; In (pérdida de peso (%))	Grupos homogéneos
CuNPs 2000 ppm	5	1,061	X
CuNPs 500 ppm	5	1,558	X
CuNPs-QuiOli 1000 ppm-4 mg/ml	5	2,739	X
CuNPs-QuiOli 250 ppm-1 mg/ml	5	3,725	X
QuiOli 1,5 mg/ml	5	3,723	X
Control	5	3,769	X
QuiOli 6 mg/ml	5	3,838	X

5.2.2.3. Evaluación cualitativa

La Figura 44 muestra una fotografía de las probetas tras la retirada del micelio el día 45 del ensayo. En ella pueden apreciarse los diferentes tonos adquiridos por la madera en función del tratamiento aplicado.

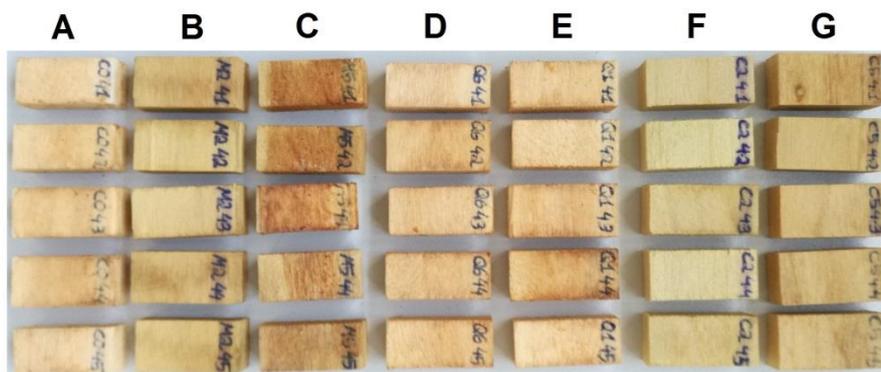


Figura 44. Aspecto de las probetas de madera correspondientes al día 45 del ensayo tras retirar el micelio. A: Control, B: CuNPs-QuiOli 1000 ppm-4 mg/ml, C: CuNPs-QuiOli 250 ppm-1 mg/ml, D: QuiOli 6 mg/ml, E: QuiOli 1,5 mg/ml, F: CuNPs 2000 ppm, G: CuNPs 500 ppm.

En la fotografía mostrada en la Figura 45 puede observarse cómo para el día 25 el micelio de *T. versicolor* está completamente extendido sobre las probetas de la placa control y de las de QuiOli, mientras que en los tratamientos de CuNPs y en los binarios apenas se aprecia recubrimiento de las mismas. Parece, por lo tanto, que las nanopartículas de cobre juegan un papel aparentemente importante a la hora de impedir la entrada del hongo en la madera, mientras que los oligómeros de quitosano no ejercen ese efecto barrera.

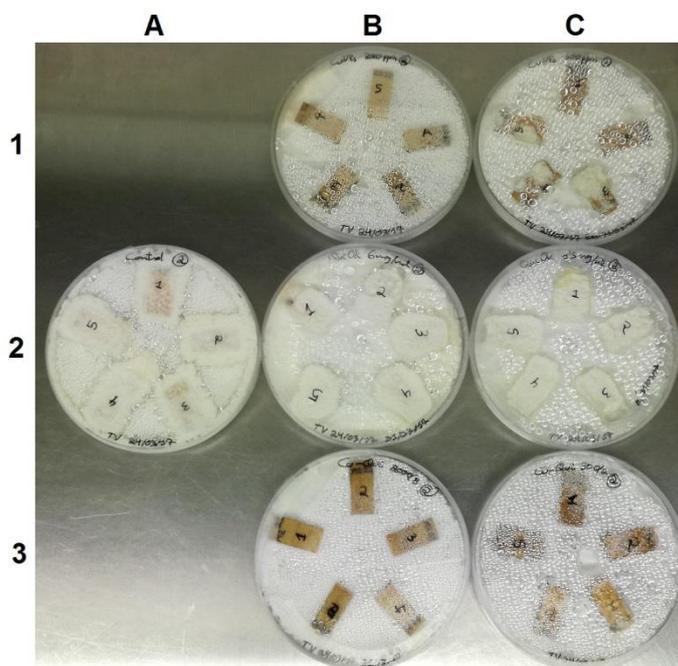


Figura 45. Aspecto de las probetas de madera antes de la retirada del micelio el día 25 desde el inicio del ensayo. A2: Control, B1: CuNPs 2000 ppm, C1: CuNPs 500 ppm, B2: QuiOli 6 mg/ml, C2: QuiOli 1,5 mg/ml, B3: CuNPs-QuiOli 1000 ppm-4 mg/ml, C3: CuNPs-QuiOli 250 ppm-1 mg/ml.

Las micrografías de las probetas de madera correspondientes al día 45 del ensayo se muestran en las Figuras 46, 47, 48 y 49. Puede observarse cómo en el tratamiento control las hifas de *T. versicolor* se han desarrollado abundantemente a través de los vasos conductores (Figura 46). Lo mismo ocurre en las probetas tratadas con QuiOli (Figura 47), lo que en ambos casos indica una alta colonización de la madera por parte del hongo. Comparativamente, en las probetas tratadas con CuNPs (Figura 48 y 49) no se aprecian hifas invadiendo los vasos, siendo solo visibles en su interior algunos restos de pared celular.

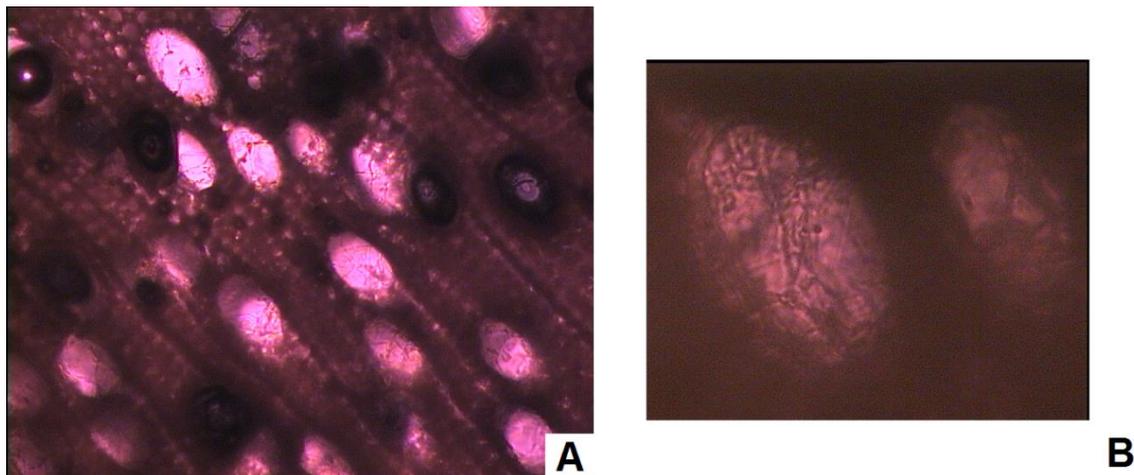


Figura 46. Micrografía correspondiente al corte transversal de una de las probetas de madera con tratamiento control evaluada el día 45 del ensayo. A: 100x, B: 400x.

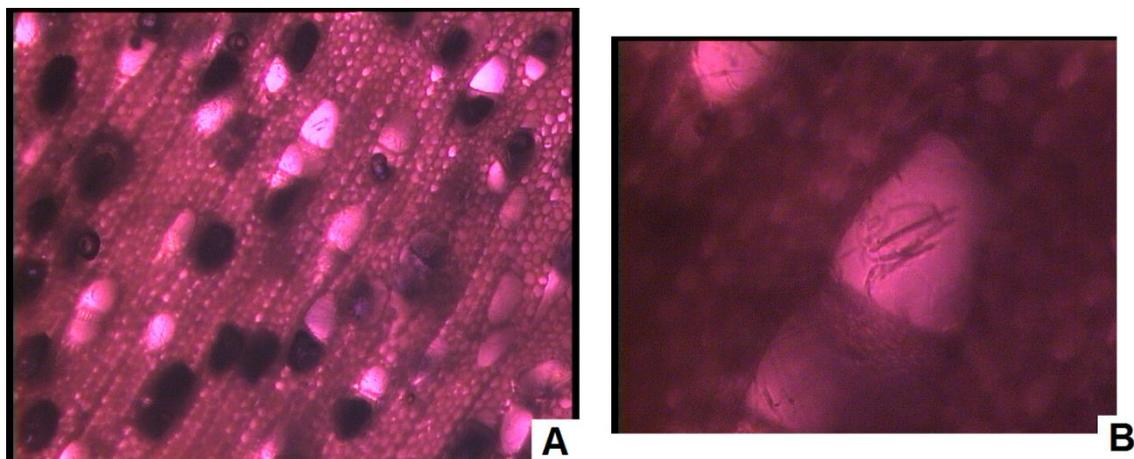


Figura 47. Micrografía correspondiente al corte transversal de una de las probetas de madera tratadas con QuiOli 6 mg/ml evaluada el día 45 del ensayo. A: 100x, B: 400x.

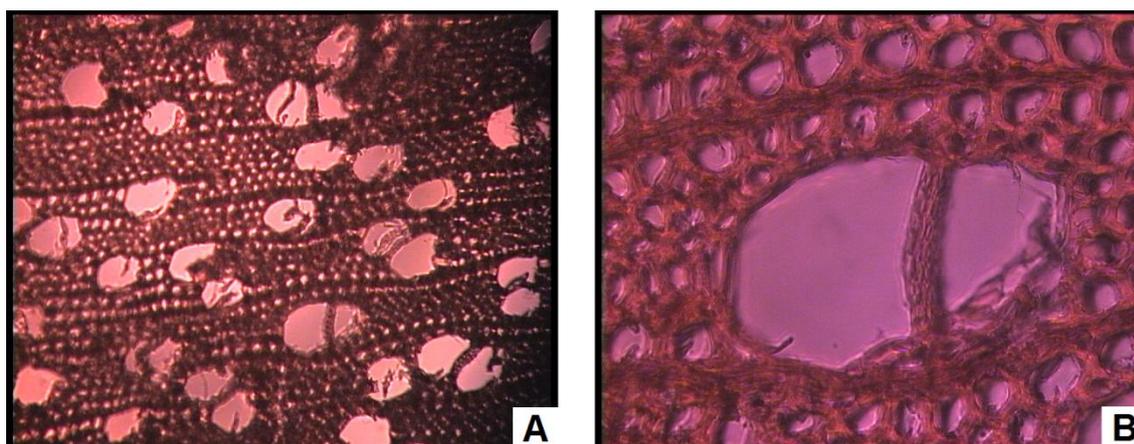


Figura 48. Micrografía correspondiente al corte transversal de una de las probetas de madera tratadas con CuNPs 500 ppm evaluada el día 45 del ensayo. A: 100x, B: 400x.

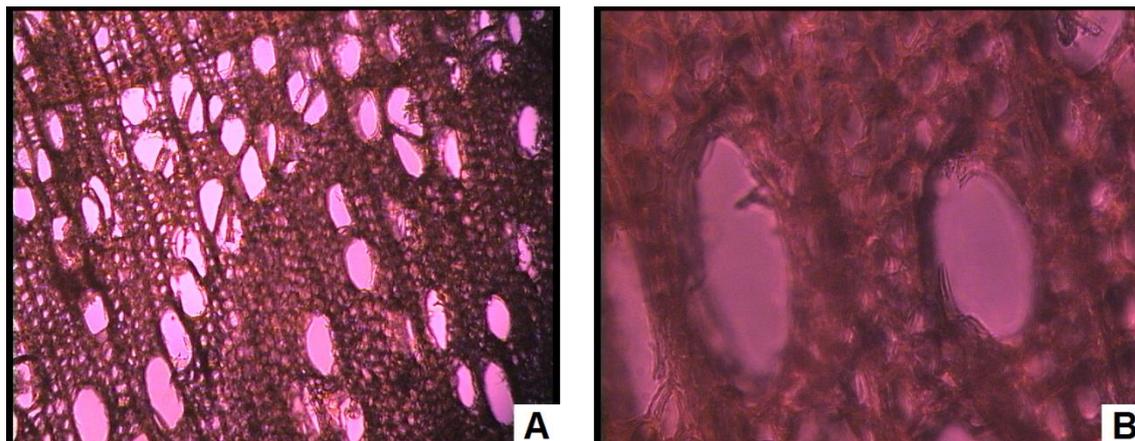


Figura 49. Micrografía correspondiente al corte transversal de una de las probetas de madera tratadas con CuNPs 2000 ppm evaluada el día 45 del ensayo. A: 100x, B: 400x.

5.2.2.4. Discusión de los resultados obtenidos

Llaman la atención, en primer lugar, dos hechos. El primero es la existencia de tratamientos que en el día 15 del ensayo presentan una pérdida de peso negativa. Esta circunstancia puede explicarse por la permanencia de parte del PDA adherido a la superficie de las probetas tras su retirada manual, lo que, al no haber actuado aún el hongo degradando la madera (o muy poco), provoca un pequeño aumento del peso de las mismas (cantidades nunca superiores a los 0,007 g).

El otro tiene que ver con que en todos los tratamientos, menos en el control y en la mezcla de CuNPs-QuiOli 250 ppm-1 mg/ml, el dato correspondiente a la media del día 45 es inferior al de la media del día 35. La explicación más probable reside en el bajo número de repeticiones realizadas por tratamiento y día (cinco), lo que unido a la variabilidad de las propias probetas de madera en sus características, puede producir diferencias significativas entre las placas preparadas para ser medidas cada día.

En cuanto a los resultados propiamente dichos, solo las CuNPs han mostrado un efecto protector de la madera frente al hongo *T. versicolor*, pues los dos tratamientos con QuiOli no se diferencian de una manera estadísticamente significativa del control. Por esta misma razón, el efecto inhibitorio mostrado por la mezcla de CuNPs-QuiOli 1000 ppm-4 mg/ml debe atribuirse en su totalidad a las CuNPs. Además, el hecho de que las probetas tratadas con CuNPs resultaran mucho menos susceptibles a ser invadidas por el hongo en el análisis cualitativo refuerza esta afirmación.

Los resultados obtenidos en cuanto a la inhibición en madera por parte de las CuNPs concuerdan notoriamente con los obtenidos por Akhtari & Arefkhani (2013) para el mismo hongo (*T. versicolor*), situándose en su caso en el 2,375 % de pérdida de masa para una concentración de 400 ppm en la dispersión, siendo de entorno al 5 % en nuestro caso, con una concentración de 500 ppm, y del 3,2 % con 2000 ppm. También los resultados reportados por Kartal, Green, & Clausen (2009) coinciden con los obtenidos en este estudio, situándose siempre por debajo del 10 %. No obstante, la pérdida de masa del tratamiento control fue en ambos casos manifiestamente inferior,

situándose en el 30 % y el 28 % respectivamente, frente al 43 % de nuestro estudio, lo que puede indicar un mayor efecto inhibitorio en nuestro caso, al ser mayor la diferencia entre las probetas tratadas y las no tratadas, aunque este hecho también puede ser debido a la diferencia en cuanto a la madera empleada (*Paulownia fortunei* y *Liquidambar sp.*, respectivamente).

Los resultados obtenidos recientemente por Paril et al., (2017) también concuerdan con los alcanzados en el presente estudio. En su caso, la pérdida de masa fue de menos del 2 % en madera de *Fagus sylvatica*, con suspensiones de CuNPs del 1 ‰ y del 3 ‰, e igualmente frente a *T. versicolor*.

La comparación de los resultados obtenidos en el ensayo con el método de dilución en agar respecto a los de la evaluación de la pérdida de peso en las probetas de madera permite sacar algunas conclusiones. Si bien con el primer método se obtuvieron concentraciones 100 % inhibitorias de todos los compuestos frente al hongo, con el segundo sólo se han obtenido inhibiciones realmente altas con las CuNPs, no mostrándose ningún efecto significativo por parte de los QuiOli y la mezcla binaria menos concentrada. Este hecho es probable que tenga su causa en una escasa impregnación de las probetas con el compuesto, debido a la ausencia de un tratamiento con aplicación de presión durante el proceso, empleándose únicamente la inmersión prolongada. No obstante, sea cual fuere la causa, se emplaza a futuros estudios el realizar impregnaciones mediante métodos de aplicación de presión en autoclave tanto para el caso de las CuNPs como para los QuiOli y las mezclas binarias.

Otro hecho relevante es que tanto para el ensayo con el método de dilución en agar como para el de inmersión de las probetas de madera, la concentración de CuNPs a 500 ppm resultó muy eficaz, siendo 100 % inhibitoria en el primer caso y ocasionando una pérdida de peso de solo el 5 % en el segundo, no diferenciándose significativamente del tratamiento con 2000 ppm. Esto sugiere que, al menos en el caso de las CuNPs, las concentraciones testadas mediante el método de dilución en agar deben ser las empleadas en los tratamientos por inmersión.

Las micrografías tomadas a las probetas de madera corroboran las observaciones realizadas anteriormente, pues únicamente en aquellas que fueron tratadas con CuNPs no se observa desarrollo alguno de hifas de *T. versicolor*, siendo estas abundantes tanto en el control como en las probetas tratadas con QuiOli.

6. Conclusiones

6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que cabe extraer del estudio son:

- Se han conseguido sintetizar los tres compuestos propuestos para el estudio: dispersiones de nanopartículas de cobre (CuNPs) mediante un método de reducción química en condiciones controladas, disoluciones de oligómeros de quitosano (QuiOli) a partir de quitosano en bruto de peso molecular medio y mezclas binarias de ambos compuestos (CuNPs-QuiOli) mediante el empleo de técnicas de sonicación.
- La posterior caracterización de los compuestos permite afirmar que las CuNPs sintetizadas se corresponden con nanopartículas de óxido de cobre (I) con pequeñas trazas de Cu metálico cuyo tamaño se sitúa entre 65 nm y 125 nm. Asimismo, que la técnica de sonicación empleada para sintetizar las mezclas binarias de CuNPs-QuiOli consigue que se formen interacciones entre ambos compuestos.
- Se ha comprobado cómo los tres compuestos sintetizados presentan actividad antifúngica frente a *Trametes versicolor* mediante el método de dilución en agar. Con las curvas de crecimiento se ha observado que esta actividad antifúngica es directamente proporcional a la concentración empleada, y además se han hallado para los tres compuestos al menos una concentración que inhibe totalmente el crecimiento del hongo, tratándose por lo tanto de la concentración mínima inhibitoria (MIC).
- Se ha demostrado que las CuNPs y los QuiOli no actúan conjuntamente de una manera sinérgica frente a *Trametes versicolor* cuando son mezclados mediante técnicas de sonicación, siendo el efecto de ambos únicamente aditivo.
- Los resultados obtenidos en cuanto a la actividad antifúngica y la concentración mínima inhibitoria (500 ppm) de las CuNPs frente a *T. versicolor* mediante el método de dilución en agar se acomodan a los alcanzados por estudios precedentes llevados a cabo con otros hongos.
- Asimismo la concentración mínima inhibitoria obtenida con los QuiOli (1,50 mg/ml) concuerda con estudios precedentes.
- Mediante la impregnación de probetas de madera de *Populus sp.* con un tratamiento de inmersión ha quedado probado que las CuNPs poseen una elevada efectividad a la hora de proteger las probetas de la acción de pudrición de *T. versicolor*, reduciendo la pérdida de peso del 43,4 % correspondiente al control hasta el 3,2 % correspondiente al tratamiento con CuNPs a una concentración de 2000 ppm.
- Al contrario que en el caso de las CuNPs, no ha podido ser demostrado el efecto protector de los QuiOli frente a *T. versicolor* en madera de *Populus sp.* La causa más probable es la no consecución de la correcta impregnación de las probetas debido a que el tratamiento es simplemente por inmersión. Se

emplaza a futuros estudios a continuar esta línea de investigación utilizando tratamientos en autoclave para poder llegar a conclusiones definitivas.

- El cotejo de los resultados obtenidos en el ensayo por inmersión de las probetas respecto a estudios precedentes permite afirmar que las CuNPs sintetizadas presentan una capacidad antifúngica frente a *T. versicolor* en madera de *Populus sp.* similar a la presentada frente al mismo hongo en otros tipos de maderas (*Paulownia fortunei*, *Liquidambar sp.* y *Fagus sylvatica*).
- La evaluación cualitativa llevada a cabo en el ensayo con el método de dilución en agar sugiere que las CuNPs están dotadas de una mayor capacidad fungicida frente a *T. versicolor* que los QuiOli, pues su acción directa sobre el micelio aparenta ser más destructiva y continuada en el tiempo que la de estos últimos.
- En el caso del ensayo por inmersión de las probetas, la evaluación cualitativa apunta hacia una mayor efectividad de las CuNPs respecto a los QuiOli a la hora de impedir la colonización tanto externa/superficial como interna por parte de *T. versicolor* de la madera de *Populus sp.* No obstante, la probablemente escasa impregnación conseguida con los QuiOli impide que deba tomarse esta conclusión de manera definitiva.

7. Agradecimientos

Alumno: Pablo Laiz Alonso
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA) – E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS
Titulación de: Máster en Ingeniería de Montes

7. AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi especial agradecimiento a losody Silva Castro por el tiempo, dedicación e interés mostrados a lo largo del desarrollo de este estudio, a veces pese a la distancia.

Al Centro Tecnológico Agrario y Agroalimentario (Itagra) por la cesión durante meses de la cámara de cultivo necesaria para realizar los ensayos; a Raúl Arcadio Fernández por su colaboración a la hora de realizar los análisis UV-Vis; a mi director Pablo Martín Ramos por la labor realizada en la caracterización de compuestos; a mí tutor Jesús Martín Gil por todos los conocimientos sobre química transmitidos y a mi cotutora Milagros Casado Sanz por su labor organizadora durante el estudio. También a mi cotutor Agustín León Alonso-Cortés, por el apoyo mostrado durante la utilización del laboratorio de microbiología.

8. Bibliografía

8. BIBLIOGRAFÍA

- Akhtari, M., & Arefkhani, M. (2013). Study of Microscopy Properties of Wood Impregnated with Nanoparticles during Exposed to White-Rot Fungus. *Agriculture Science Developments*, 2(11), 116-119.
- ALI, Z. I., GHAZY, O. A., MELIGI, G., SALEH, H. H., & BEKHIT, M. (2016). Radiation-Induced Synthesis of Copper/Poly(vinyl alcohol) Nanocomposites and Their Catalytic Activity. *Advances in Polymer Technology*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/adv.21675>
- Allan, C. R., & Hadwiger, L. A. (1979). The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Experimental Mycology*, 3(3), 285-287. [https://doi.org/10.1016/S0147-5975\(79\)80054-7](https://doi.org/10.1016/S0147-5975(79)80054-7)
- Badawy, M. E. I., & Rabea, E. I. (2009). Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 51(1), 110-117. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.05.018>
- Badawy, M. E. I., & Rabea, E. I. (2011). A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2011, 1-29. <https://doi.org/10.1155/2011/460381>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Benhamou, N., Lafontaine, P., & Nicole, M. (1994). Induction of systemic resistance to *Fusarium crown and root rot* in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology*.
- Blosi, M., Albonetti, S., Dondi, M., Martelli, C., & Baldi, G. (2011). Microwave-assisted polyol synthesis of Cu nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(1), 127-138. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-0010-7>
- Boddy, L. (1983). Effect of temperature and water potential on growth rate of wood-rotting basidiomycetes. *Transactions of the British Mycological Society*, 80(1), 141-149. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(83\)80175-2](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(83)80175-2)
- Boonlertnirun, S., Boonraung, C., & Suvanasa, R. (2008). Application of chitosan in rice production. *Journal of metals, materials and minerals*, 18(2), 47-52. Recuperado a partir de <http://www.material.chula.ac.th/Journal..v18-2/47-52> Boonlertnirun, S.pdf
- Capaldi Arruda, S. C., Diniz Silva, A. L., Moretto Galazzi, R., Antunes Azevedo, R., & Zezzi Arruda, M. A. (2015). Nanoparticles applied to plant science: A review. *Talanta*, 131(January), 693-705. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.050>
- Castro Silva, I. (2015). Síntesis de nuevos composites de oligómeros de quitosano, propóleo y nanoplata como fungicidas en Ingeniería Agroforestal. *Trabajo fin de Máster. Universidad de Valladolid*.
- Chang, Y., Zhang, M., Xia, L., Zhang, J., & Xing, G. (2012). The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. *Materials*, 5(12), 2850-2871. <https://doi.org/10.3390/ma5122850>

- Chen, Y., Chen, L., Bai, H., & Li, L. (2013). Graphene oxide–chitosan composite hydrogels as broad-spectrum adsorbents for water purification. *Journal of Materials Chemistry A*, 1(6), 1992. <https://doi.org/10.1039/c2ta00406b>
- Chirkov, S. N. (2002). The antiviral activity of chitosan. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38(1), 5-13. <https://doi.org/10.1023/a:1013206517442>
- Concha Murray, M. L., Moreno Villoslada, I., Orellana Donoso, S. L., Oyarzun Ampuero, F., Vidal Villa, M. A., Giacaman Fonseca, A. G., ... Jofre Rivas, S. P. (2013). Biomaterial que comprende quitosano y al menos glicosaminoglicano.
- Das, R., Gang, S., Nath, S. S., & Bhattacharjee, R. (2010). Linoleic Acid Capped Copper Nanoparticles for Antibacterial Activity. *Journal of Bionanoscience*, 4(1-2).
- Dhas, N. A., Raj, C. P., & Gedanken, A. (1998). Synthesis , Characterization , and Properties of Metallic Copper Nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 4756(10), 1446-1452.
- Dong, C., Cai, H., Zhang, X., & Cao, C. (2014). Synthesis and characterization of monodisperse copper nanoparticles using gum acacia. *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, 57, 12-20. <https://doi.org/10.1016/j.physe.2013.10.025>
- Dutta, P. K., Dutta, J., & Tripathi, V. S. (2004). Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 63(1), 20-31. <https://doi.org/10.1002/chin.200727270>
- El Ghaouth, A., Arul Wilson, C., J., & Benhamou, N. (1997). Biochemical and cytochemical aspects of chitosan and Botrytis cinerea in bell pepper fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 12, 183–194.
- El Hassni, M., El Hadrami, A., Daayf, F., Barka, E. A., & El Hadrami, I. (2004). Chitosan, antifungal product against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* and elicitor of defence reactions in date palm roots. *Phytopathologia Mediterranea*, 43(2), 195-204.
- Ghasemian, E., Naghoni, A., Tabaraie, B., & Tabaraie, T. (2012). In vitro susceptibility of filamentous fungi to copper nanoparticles assessed by rapid XTT colorimetry and agar dilution method. *Journal de Mycologie Medicale*, 22(4), 322-328. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2012.09.006>
- Giannossa, L. C., Longano, D., Ditaranto, N., Nitti, M. A., Paladini, F., Pollini, M., ... Cioffi, N. (2013). Metal nanoantimicrobials for textile applications. *Nanotechnology Reviews*, 2(3), 307-331. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2013-0004>
- Goalakrishnan, K., Ramesh, C., Ragunathan, V., & Thamiselvan, M. (2012). Antibacterial activity of Cu₂O nanoparticles on E.Coli synthesized from *Tridax Procumbens* leaf extract and surface coating with polyaniline. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7(2), 833-839.
- Granata, G., Yamaoka, T., Pagnanelli, F., & Fuwa, A. (2016). Study of the synthesis of copper nanoparticles: the role of capping and kinetic towards control of particle size and stability. *Journal of Nanoparticle Research*, 18. <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3438-6>
- Hadwiger, L. A., Kendra, D. F., Fristensky, B. W., & Wagoner, W. (1986). Chitosan Both Activates Genes in Plants and Inhibits RNA Synthesis in Fungi. En R. Muzzarelli, C. Jeuniaux, & G. W. Gooday (Eds.), *Chitin in Nature and Technology*

Alumno: Pablo Laiz Alonso

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA) – E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS

Titulación de: Máster en Ingeniería de Montes

- (pp. 209-214). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2167-5_28
- Harne, S., Sharma, A., Dhaygude, M., Joglekar, S., Kodam, K., & Hudlikar, M. (2012). Novel route for rapid biosynthesis of copper nanoparticles using aqueous extract of *Calotropis procera* L. latex and their cytotoxicity on tumor cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95(March), 284-288. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.03.005>
- Hasan, S. S., Singh, S., Parikh, R. Y., Dharne, M. S., Patole, M. S., Prasad, B. L. V, & Shouche, Y. S. (2008). Bacterial synthesis of copper/copper oxide nanoparticles. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 8(6), 3191-3196. <https://doi.org/10.1166/jnn.2008.095>
- Higazy, A., Hashem, M., ElShafei, A., Shaker, N., & Hady, M. A. (2010). Development of antimicrobial jute packaging using chitosan and chitosan-metal complex. *Carbohydrate Polymers*, 79(4), 867-874. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.011>
- Ingle, A. P., Duran, N., & Rai, M. (2014). Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(3), 1001-1009. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5422-8>
- Iriti, M., & Varoni, E. M. (2015). Chitosan-induced antiviral activity and innate immunity in plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(4), 2935-2944. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3571-7>
- Jeon, Y. J., Park, P. J., & Kim, S. K. (2001). Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymers*, 44(1), 71-76. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00200-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00200-9)
- Kang, B., Dai, Y. dong, Zhang, H. qian, & Chen, D. (2007). Synergetic degradation of chitosan with gamma radiation and hydrogen peroxide. *Polymer Degradation and Stability*, 92(3), 359-362. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2006.12.006>
- Kartal, S. N., Green, F., & Clausen, C. A. (2009). Do the unique properties of nanometals affect leachability or efficacy against fungi and termites? *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63(4), 490-495. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.01.007>
- Karthik, A. D., & Geetha, K. (2014). Synthesis and characterization of Copper and Copper Oxide nanoparticles by thermal decomposition method. *International Journal of Nano Dimension*, 5(4), 321-327.
- Kliche, G., & Popovic, Z. V. (1990). Far-infrared spectroscopic investigations on CuO. *Physical Review B*, 42(16), 10060-10066. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.42.10060>
- Kumar, R. V., Mastai, Y., Diamant, Y., & Gedanken, a. (2001). Sonochemical synthesis of amorphous Cu and nanocrystalline Cu₂O embedded in a polyaniline matrix. *Journal of Materials Chemistry*, 11(4), 1209-1213. <https://doi.org/10.1039/b005769j>
- Lee, H. J., Lee, G., Jang, N. R., Yun, J. H., Song, J. Y., & Kim, B. S. (2011). Biological synthesis of copper nanoparticles using plant extract. *Nanotechnology*, 1, 371-374.
- Liu, X. F., Guan, Y. L., Yang, D. Z., Li, Z., & Yao, K. D. (2000). Antibacterial Action of

- Chitosan and Carboxymethylated Chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 79(March), 1324-1335. [https://doi.org/10.1002/1097-4628\(20010214\)79:7<1324::AID-APP210>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1097-4628(20010214)79:7<1324::AID-APP210>3.0.CO;2-L)
- Liu, Z., & Bando, Y. (2003). A Novel Method for Preparing Copper Nanorods and Nanowires. *Advanced Materials*, 15(4), 303-305. <https://doi.org/10.1002/adma.200390073>
- Mekahlia, S., & Bouzid, B. (2009). Chitosan-Copper (II) complex as antibacterial agent: synthesis, characterization and coordinating bond- activity correlation study. *Physics Procedia*, 2(3), 1045-1053. <https://doi.org/10.1016/j.phpro.2009.11.061>
- Paril, P., Baar, J., Cermák, P., Rademacher, P., Pucek, R., Sivera, M., & Panáček, A. (2017). Antifungal effects of copper and silver nanoparticles against white and brown-rot fungi. *Journal of Materials Science*, 52(5), 2720-2729. <https://doi.org/10.1007/s10853-016-0565-5>
- Park, S.-I., Stan, S. D., Daeschel, M. A., & Zhao, Y. (2005). Antifungal Coatings on Fresh Strawberries (*Fragaria x ananassa*) to Control Mold Growth During Cold Storage. *Journal of Food Science*, 70(4), 202-207. <https://doi.org/101111>
- Primo, A., Esteve-Adell, I., Blandez, J. F., Dhakshinamoorthy, A., Álvaro, M., Candu, N., ... García, H. (2015). High catalytic activity of oriented 2.0.0 copper(I) oxide grown on graphene film. *Nature Communications*, (4), 8561. <https://doi.org/10.1038/ncomms9561>
- Qin, Y., Liu, S., Xing, R., Yu, H., Li, K., Meng, X., ... Li, P. (2012). Synthesis and characterization of dithiocarbamate chitosan derivatives with enhanced antifungal activity. *Carbohydrate Polymers*, 89(2), 388-393. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.018>
- Reddy, M. V. B., Angers, P., Castaigne, F., & Arul, J. (2000). Chitosan Effects on Blackmold Rot and Pathogenic Factors Produced by *Alternaria alternata* in Postharvest Tomatoes, 125(6), 742-747.
- Reddy, M. V. B., Arul, J., Angers, P., & Couture, L. (1999). Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 1208-1216. <https://doi.org/10.1021/jf981225k>
- Rezaei, V. T., Usefi, A., & Soltani, M. (2011). Wood protection by nano silver against white rot. *5th Symposium on Advances in Science & Technology*, (April 2011), 1-9.
- Rhazi, M., Tolaimate, A., Rhazi, M., Desbri??res, J., Tolaimate, A., Rinaudo, M., ... Vottero, P. (2001). Contribution to the study of the complexation of copper by chitosan and oligomers. *Polymer*, 43(4), 1267-1276. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(01\)00685-1](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(01)00685-1)
- Rodríguez Barreal, J. A. (1998). *Patología de la madera*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Romanazzi, G., Nigro, F., Ippolito, a., DiVenere, D., & Salerno, M. (2002). Effects of Pre- and Postharvest Chitosan Treatments to Control Storage Grey Mold of Table Grapes. *Journal of Food Science*, 67(5), 1862-1867. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08737.x>
- Ruparelia, J. P., Chatterjee, A. K., Duttagupta, S. P., & Mukherji, S. (2008). Strain

Alumno: Pablo Laiz Alonso

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA) – E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS

Titulación de: Máster en Ingeniería de Montes

- specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 4(3), 707-716. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.11.006>
- Saharan, V., Mehrotra, A., Khatik, R., Rawal, P., Sharma, S. S., & Pal, A. (2013). Synthesis of chitosan based nanoparticles and their in vitro evaluation against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 677-683. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.012>
- Saharan, V., Sharma, G., Yadav, M., Kumari, M., Sharma, S. S., Pal, A., ... Biswas, P. (2015). Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu – chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75, 346-353. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.027>
- Schaumberg, C. A., Wollgarten, M., & Rademann, K. (2014). Metallic copper colloids by reductive laser ablation of nonmetallic copper precursor suspensions. *Journal of Physical Chemistry A*, 118(37), 8329-8337. <https://doi.org/10.1021/jp501123y>
- Schrand, A. M., Rahman, M. F., Hussain, S. M., Schlager, J. J., Smith, D. A., & Syed, A. F. (2010). Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2(5), 544-568. <https://doi.org/10.1002/wnan.103>
- Shah, V., Dobiášová, P., Baldrian, P., Nerud, F., Kumar, A., & Seal, S. (2010). Influence of iron and copper nanoparticle powder on the production of lignocellulose degrading enzymes in the fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials*, 178(1-3), 1141-1145. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.01.141>
- Sierra-Ávila, R., Pérez-Alvarez, M., Cadenas-Pliego, G., Comparán Padilla, V., Ávila-Orta, C., Pérez Camacho, O., ... Jiménez-Barrera, R. M. (2015). Synthesis of Copper Nanoparticles Using Mixture of Allylamine and Polyallylamine. *Journal of Nanomaterials*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/367341>
- Slinker, B. K. (1998). The Statistics of Synergism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 30, 723-731.
- Stohs, S. J., & Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(2), 321-336. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00159-H](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-H)
- Sun, T., Zhou, D., Xie, J., & Mao, F. (2007). Preparation of chitosan oligomers and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 225(3-4), 451-456. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0439-1>
- Tantubay, S., Mukhopadhyay, S. K., Kalita, H., Konar, S., Dey, S., Pathak, A., & Pramanik, P. (2015). Carboxymethylated chitosan-stabilized copper nanoparticles: a promise to contribute a potent antifungal and antibacterial agent. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(6), 1-18. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-3047-9>
- Theron, J., Walker, J. A., & Cloete, T. E. (2008). Nanotechnology and water treatment: applications and emerging opportunities. *Critical reviews in microbiology*, 34(1), 43-69. <https://doi.org/10.1080/10408410701710442>
- Tsai, G. J., & Su, W. H. (1999). Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *Journal of food protection*, 62(3), 239-43. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10090242>
- Usman, M. S., Ibrahim, N. A., Shameli, K., Zainuddin, N., & Yunus, W. M. Z. W. (2012).

Alumno: Pablo Laiz Alonso

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA) – E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS

Titulación de: Máster en Ingeniería de Montes

- Copper nanoparticles mediated by chitosan: Synthesis and characterization via chemical methods. *Molecules*, 17(12), 14928-14936. <https://doi.org/10.3390/molecules171214928>
- Van Cao, D., Nguyen, P. P., Khuong, V. Q., Nguyen, C. K., Nguyen, X. C., Dang, C. H., & Tran, N. Q. (2014). Ultrafine copper nanoparticles exhibiting a powerful antifungal/killing activity against *Corticium salmonicolor*. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 35(9), 2645-2648. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2014.35.9.2645>
- Varshney, R., Bhadauria, S., Gaur, M. S., & Pasricha, R. (2010). Characterization of copper nanoparticles synthesized by a novel microbiological method. *Jom*, 62(12), 102-104. <https://doi.org/10.1007/s11837-010-0171-y>
- Viet, P. Van, Nguyen, H. T., Cao, T. M., Hieu, L. Van, Viet, P. Van, Nguyen, H. T., ... Hieu, L. Van. (2016). *Fusarium* Antifungal Activities of Copper Nanoparticles Synthesized by a Chemical Reduction Method. *Journal of Nanomaterials*, 2016, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2016/1957612>
- Vold, I. M. N., Vårum, K. M., Guibal, E., & Smidsrød, O. (2003). Binding of ions to chitosan—selectivity studies. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 471-477. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.07.001>
- Wang, X., Du, Y., & Liu, H. (2004). Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex. *Carbohydrate Polymers*, 56(1), 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.11.007>
- Young, D. H., & Kauss, H. (1983). Release of Calcium from Suspension-Cultured *Glycine max* Cells by Chitosan, Other Polycations, and Polyamines in Relation to Effects on Membrane Permeability. *Plant physiology*, 73(3), 698-702. <https://doi.org/10.1104/pp.73.3.698>
- Zeng, D., Wu, J., & Kennedy, J. F. (2008). Application of a chitosan flocculant to water treatment. *Carbohydrate Polymers*, 71(1), 135-139. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.07.039>
- Zhang, D., & Yang, H. (2013). Gelatin-stabilized copper nanoparticles: Synthesis, morphology, and their surface-enhanced Raman scattering properties. *Physica B: Condensed Matter*, 415, 44-48. <https://doi.org/10.1016/j.physb.2013.01.041>
- Ziegler, K. J., Doty, R. C., Johnston, K. P., & Korgel, B. A. (2001). Synthesis of organic monolayer-stabilized copper nanocrystals in supercritical water. *Journal of the American Chemical Society*, 123(32), 7797-7803. <https://doi.org/10.1021/ja010824w>