



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Máster en Ingeniería de Montes

Evaluación de la acción fungicida de nanopartículas de plata, oligómeros de quitosano y propóleo frente a la pudrición blanca (*Trametes versicolor* (L.) Lloyd), sobre madera de *Populus* sp. tratada mediante autoclave

Alumno: Laura Ponce Herrero

Tutora: M^a Milagrosa Casado Sanz
Cotutor: Luis Acuña Rello

Julio de 2018

Evaluación de la acción fungicida de nanopartículas de plata, oligómeros de quitosano y propóleo frente a la pudrición blanca (*Trametes versicolor* (L.) Lloyd), sobre madera de *Populus* sp. tratada mediante autoclave

Resumen

La madera es un material orgánico susceptible del ataque de organismos xilófagos, entre los que se encuentran los hongos de pudrición. Los hongos de pudrición blanca, como *Trametes versicolor* (L.) Lloyd, se alimentan de la lignina de la madera modificando sus propiedades físico-mecánicas. La madera ha sido tratada desde los inicios de la humanidad para aumentar su durabilidad. Los métodos de tratamiento han evolucionado con las necesidades humanas, produciéndose en el siglo XIX el mayor avance en tecnología de protección de la madera con la invención del autoclave, sistema basado en la impregnación de la madera mediante aplicación de presión.

Los protectores de madera utilizados tradicionalmente contienen elementos perjudiciales para el ser humano y el medio ambiente. La prohibición del uso de este tipo de protectores, junto al aumento de la concienciación social frente a la protección del medio ambiente y la salud humana, ha impulsado la búsqueda de nuevos productos protectores de la madera sintetizados a base de productos naturales o inocuos. En este trabajo, se ha testado la capacidad antifúngica de cuatro concentraciones diferentes de tres tratamientos; nanoplata, oligómeros de quitosano y propóleo. Las nanopartículas metálicas presentan propiedades diferentes de la de sus componentes no nanométricos, debido fundamentalmente al aumento de su área efectiva protectora. Los oligómeros de quitosano y el propóleo son utilizados por diferentes sectores por su capacidad antifúngica, además, proceden de elementos naturales presentes en la naturaleza, por lo que presentan un carácter totalmente inocuo. El método utilizado para testar la efectividad antifúngica de los tratamientos se basa en la Norma EN:113. Piezas de madera de *Populus* sp. fueron impregnadas mediante autoclave con cuatro concentraciones diferentes de los tres productos; nanoplata, oligómeros de quitosano y propóleo, mientras que su efecto fue testado *in vitro* mediante exposición de la madera al hongo de pudrición blanca *T. versicolor*. Para comprobar la eficacia de las diferentes concentraciones a lo largo del tiempo se realizaron tres muestreos, a las 4, 8 y 12 semanas de exposición al hongo. En cada uno de estos muestreos se calculó la pérdida de masa de la madera tratada, y se comparó con la pérdida de masa de los controles, madera expuesta a la acción fúngica sin ningún tratamiento protector. La efectividad antifúngica de los tratamientos de oligómeros de quitosano y propóleo se pierde con el tiempo, debido a su carácter biodegradable, mientras que el tratamiento con nanopartículas de plata protege a la madera con un grado de protección similar, independientemente de la concentración testada, y a largo plazo. Se debería seguir investigando con concentraciones más altas y resolviendo los problemas de síntesis de dichos compuestos para conseguir una mayor efectividad y a largo plazo.

Palabras clave: Norma EN:113, hongos xilófagos, protección natural, productos antifúngicos, tratamiento de presión.

Índice

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	ESTRUCTURA DE LA MADERA	1
1.2	AGENTES QUE PUEDEN DEGRADAR LA MADERA	2
1.3	EVOLUCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS UTILIZADOS PARA AUMENTAR LA DURABILIDAD DE LA MADERA.....	4
1.4	PROTECCIÓN DE LA MADERA FRENTE A HONGOS DE PUDRICIÓN MEDIANTE NANOPLATA, OLIGÓMEROS DE QUITOSANO Y PROPÓLEO .6	
1.4.1	Nanopartículas de plata.....	7
1.4.2	Oligómeros de quitosano.....	9
1.4.3	Propóleo.....	11
1.5	EL Populus Y SU MADERA	12
2	OBJETIVOS.....	13
3	MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
3.1	EQUIPOS Y COMPUESTOS QUÍMICOS	13
3.2	MATERIAL BIOLÓGICO	14
3.3	CARACTERÍSTICAS Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE MADERA.....	14
3.4	SÍNTESIS DE PRODUCTOS ANTIFÚNGICOS.....	15
3.4.1	Preparación de las soluciones de nanoplata	16
3.4.2	Preparación de las soluciones de oligómeros de quitosano	16
3.4.3	Preparación de las soluciones de propóleo	17
3.5	IMPREGNACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	18
3.5.1	Autoclave y ciclo de autoclavado.....	18
3.5.2	Impregnación de las muestras.....	21
3.5.3	Estabilización de las muestras	23
3.6	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FÚNGICA	23
3.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	29
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1	ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.....	29
4.1.1	Muestreo 1	29
4.1.2	Muestreo 2	31

4.1.3	Muestreo 3	33
4.2	ESTADÍSTICA COMPARATIVA.....	35
4.2.1	Tratamientos con nanoplata	36
4.2.2	Tratamientos con oligómeros de quitosano	37
4.2.3	Tratamientos con propóleo.....	38
4.2.4	Comparación de los tratamientos respecto a los controles por muestreo.....	39
4.2.5	Comparación de los tratamientos con los controles con independencia del tiempo	42
4.3	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	45
4.3.1	Degradación de la madera de <i>Populus</i> sp. por <i>Trametes versicolor</i>	45
4.3.2	Tratamientos con nanoplata	46
4.3.3	Tratamientos con oligómeros de quitosano	49
4.3.4	Tratamientos con propóleo.....	52
5	CONCLUSIONES	53
6	BIBLIOGRAFÍA	55
7	AGRADECIMIENTOS	60

1 **INTRODUCCIÓN**

1.1 **ESTRUCTURA DE LA MADERA**

La madera es el “conjunto de tejidos del xilema que forman el tronco, las raíces y las ramas de los vegetales leñosos, excluida la corteza”. Se trata de un material heterogéneo formado por un conjunto de células especializadas encargadas de la conducción de la savia, el almacenamiento y transformación de los nutrientes y el sostén vegetal (Arriaga *et al.*, 1994).

Es un material orgánico cuya resistencia al deterioro depende de su micro y macroestructura, composición química, humedad, durabilidad natural y permeabilidad.

La microestructura de la madera se refiere a su estructura a nivel celular. Las propiedades físico-químicas de la madera dependen de las propiedades físico-químicas de las paredes celulares, constituidas por la pared primaria, la pared secundaria y la membrana terciaria. Las células se unen entre sí mediante una estructura denominada laminilla media (Figura 1 izquierda). La composición química de las paredes celulares es de gran importancia frente al ataque de patógenos, ya que tanto las células de parénquima como los componentes de la pared celular sirven de nutrientes a los organismos xilófagos. Las paredes celulares de las frondosas están constituidas por celulosa (42 – 52%), polímero de glucosa con carácter hidrófilo que se agrupa formando microfibrillas, que a su vez se agrupan en macrofibrillas con una resistencia a la tracción superior a la del acero, 10.000 kp/cm². Lignina (19 – 25%) polímero tridimensional con anillos aromáticos, no hidrolizable, con una resistencia a la compresión superior a la del hormigón, 2.400 kp/cm², que sirve como elemento de unión de la celulosa entre sí y con la hemicelulosa (23 – 31%), tercer componente de la pared celular constituida por polisacáridos, generalmente pentosanos (C₅H₈O₄)_x y hexanos (C₆H₈O₄)_x. La red de conducción de savia bruta y elaborada de la madera presenta vasos longitudinales y transversales, con una luz de entre 20 y 40 µm de diámetro (Matsunaga, 2009).

La macroestructura de la madera es el conjunto de tejidos formados por la corteza o capa exterior protectora formada por células muertas, el floema o tejido conductor de savia elaborada, el cambium o tejido meristemático formador de madera o xilema hacia el interior y de corteza hacia el exterior, y el xilema, tejido constituido por dos capas, albura o parte externa conductora de la savia bruta y duramen o parte interior lignificada sin función conductora debido al taponamiento de las punteaduras (Figura 1 derecha). El duramen presenta una mayor resistencia al ataque de los patógenos que la albura debido a la falta de función conductora y a la presencia de tejidos impregnados de sustancias con cierto valor antiséptico (Arriaga *et al.*, 1994; Rodríguez, 1996).

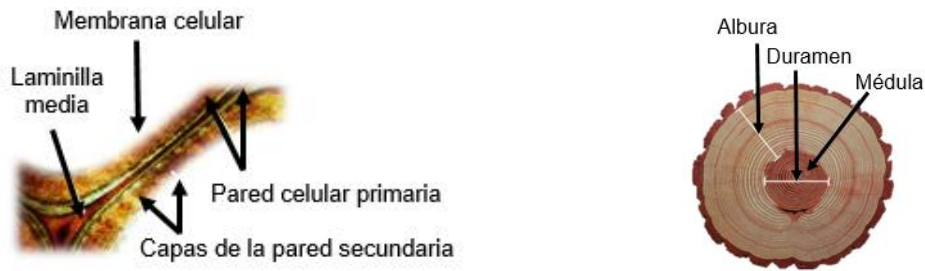


Figura 1. Microestructura de la madera (izquierda) y macroestructura de la madera (derecha). Fuentes: Fpl. (2011) y Biología vegetal. (2012).

La humedad de la madera es un factor con gran importancia patológica, ya que cuando se encuentra por encima del 22%, la madera comienza a ser susceptible al ataque de organismos xilófagos. El contenido de humedad de la madera también influye sobre el tipo producto protector a aplicar y su sistema de aplicación.

La durabilidad natural de la madera es la resistencia intrínseca frente a agentes bióticos. Esta varía entre especies y dentro de una misma especie en función de la parte del árbol de la que procede la madera, la proporción de albura y duramen que presenta y la presencia de productos como fenoles o taninos (Rodríguez, 1998).

La permeabilidad o impregnabilidad de la madera es la capacidad de penetración de un líquido protector en su interior. Esta característica depende de la estructura anatómica de la madera (Peraza, 2011), siendo la madera albura más permeable que la de duramen, ya que se encarga del transporte de la savia bruta y sus elementos conductores se encuentran libres de depósitos o thyllosis (expansiones vesiculares de las células parenquimatosas que obturan los vasos próximos), mientras que la madera de duramen presenta los lúmenes celulares ocluidos por resinas, fenoles, taninos, sustancias colorantes o sustancias minerales como carbonato, oxalato cálcico y ácido silícico (García *et al.*, 2003).

1.2 AGENTES QUE PUEDEN DEGRADAR LA MADERA

La madera es un material perecedero que puede ser deteriorada o alterada por agentes abióticos o bióticos. Se consideran agentes abióticos los agentes químicos (ácidos, bases, contaminantes atmosféricos, sales, aerosoles, etc.), los agentes físico-químicos (radiación solar y fuego) y los agentes físico-mecánicos (temperaturas extremas, acción física del agua, humedad, partículas atmosféricas y fricción). Mientras que como agentes bióticos se incluyen a las bacterias, algas, mohos, hongos cromógenos y de pudrición, insectos xilófagos y xilófagos marinos.

Los hongos de pudrición degradan la madera con un contenido de humedad superior al 22% y con una temperatura comprendida entre los 18 y los 28°C. Las esporas se producen en los cuerpos de fructificación de los micelios formados en la superficie de madera atacada y entran en contacto con la superficie de madera sana por transporte por el viento, el agua o insectos, o por contacto con madera atacada o con alguna superficie con esporas. Si las condiciones ambientales son las adecuadas, las esporas germinan originando hifas que se introducen mediante penetración activa (con acción

enzimática) a través de los elementos leñosos, vasos y traqueidas de la albura, para alimentarse de las holocelulosas y de la lignina de la pared celular mediante la secreción de enzimas capaces de metabolizar estas estructuras, provocando pérdida de masa, pérdida de resistencia físicomecánica, cambios de color, aumentos del contenido de humedad y variación de la conductividad eléctrica y térmica.

Los hongos de pudrición se clasifican en hongos de pudrición parda o cúbica, blanda y blanca. Los hongos de pudrición parda son Ascomicetes que se alimentan de las celulosas, pentosas y hemicelulosas de la pared celular, dejando intacta la lignina, por lo que generan a un aspecto degradado de la madera en forma de paralelepípedos con tonos marrones por la presencia mayoritaria de lignina (Figura 2 izquierda). Los hongos de pudrición blanda son Ascomicetes que afectan a madera con un alto contenido de humedad, alimentándose de la celulosa de la pared secundaria, aportando un aspecto blando y esponjoso a la madera. Finalmente, los hongos de pudrición blanca son Basidiomicetes que se alimentan de la lignina, y en menor grado de la celulosa y hemicelulosa. Las hifas penetran en los lúmenes celulares donde segregan una serie de enzimas que mineralizan algunos componentes químicos de la pared celular (ligninas naturales, ligninas clorinadas, ligninas de bajo peso molecular y fenoles policlorados) hasta la laminilla media. Estas enzimas son: enzimas extracelulares (mono y digenasas), coenzimas de oxidación reducción, quinonas que actúan como moléculas de transporte electrónico y peroxidadasas lignolíticas y de mangnesio. La eliminación de la lignina y los restos de celulosa por parte del hongo, aportan a la madera un aspecto fibroso y blanquecino debido al complejo celulósico resultante de la degradación (Figura 2 derecha). Los hongos de pudrición blanca suelen afectar más a las frondosas que a las coníferas por su mayor contenido de lignina y por la existencia de hemicelulosas no presentes en coníferas. Entre los hongos de pudrición blanca se encuentra *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (Polyporales:Polyporaceae) caracterizado por sus pequeñas hifas (0,5 - 4 μm) y por sus cuerpos fructíferos duros y aterciopelados, con forma de abanico con bandas concéntricas de múltiples colores en su parte superior y con poros de color blanco crema en su parte inferior (Rodríguez, 1988; Peraza, 2001).



Figura 2. Madera atacada por hongos de pudrición parda o cúbica (izquierda) y madera atacada por hongos de pudrición blanca (derecha). Fuente: Vignote & Rojas (2016).

1.3 EVOLUCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS UTILIZADOS PARA AUMENTAR LA DURABILIDAD DE LA MADERA

La madera ha sido utilizada desde la antigüedad para la fabricación de todo tipo de herramientas y estructuras por su disponibilidad y accesibilidad, facilidad de transformación y trabajabilidad, y por sus propiedades físico-mecánicas, como la resistencia a la tracción y la compresión (Arriaga *et al.*, 1994). A lo largo de la historia se ha tratado la madera para incrementar su vida útil mediante la selección de especies más durables o mediante la aplicación de técnicas de conservación. El primer registro de madera protegida es una lanza con la punta endurecida al fuego con 250.000 años de antigüedad, posteriores descubrimientos ponen de manifiesto el uso de simples métodos de tratamiento de la madera como la carbonización (Figura 3 izquierda), la aplicación de aceites para evitar la pudrición o la colocación de la madera sobre una piedra para evitar el contacto con el suelo o la humedad.

Los productos y sistemas de aplicación para el tratamiento de la madera han evolucionado a través de las civilizaciones. Las técnicas de conservación utilizadas por la civilización egipcia, basadas en la aplicación de betunes y aceites, ha permitido la conservación de muebles, sarcófagos, utensilios y barcos en perfecto estado hasta la actualidad (Figura 3 centro y derecha). La civilización griega mejoró la técnica de impermeabilización, aplicando bitumen o breas, y la de penetración y absorción de los aceites realizando incisiones y orificios en la madera. El romano Plinio el Viejo (234-142 a.J.C.) describió resistencia a la pudrición que presentaban algunas especies resinosas frente a otras especies, y observó que la madera sumergida en el Mar Rojo permanecía inalterable durante cientos de años, mientras que la utilizada en las embarcaciones marítimas era degradada en pocas décadas. Por otro lado, este autor describió la forma de sintetizar diferentes aceites para la protección de la madera y registró varios ejemplos griegos de madera tratada, como el estrado recubierto con una capa de asfalto que sostenía al Zeus de Phidias en el Monte Olimpo. Además de los escritos de Plinio el Viejo, existen otros indicios de que la civilización romana protegía su madera, como son las apeas de mina impregnadas con sales de cobre.



Figura 3. De izquierda a derecha: Extremo redondeado de un palo excavador neardental con indicios de haber sido sometido al fuego; sarcófago de madera del antiguo Egipto; figuras de madera localizadas junto al sarcófago de un niño egipcio. Fuentes: National Geographic (2013, 2018a, 2018b).

Tras la caída del imperio romano no se registraron avances en el tratamiento de la madera hasta las épocas del Descubrimiento, cuando los europeos aprendieron

técnicas de tratamiento de la madera basadas en el uso de resinas y caucho. Entre 1600 y 1900 los estudios sobre protección de la madera se centraron en la industria naval, ya que sufrió grandes pérdidas económicas por el ataque de hongos de pudrición seca y xilófagos marinos. Estos tratamientos consistieron en la carbonización superficial de la madera, la aplicación de breas y alquitranes en las juntas, el recubrimiento superficial con pinturas en la parte no sumergida y con placas de cobre en las partes sumergidas, sin embargo, todas estas técnicas fracasaron. Los métodos de protección desarrollados entre los siglos XVII y XVIII se basaron en la aplicación superficial, por impregnación o inmersión, de productos como el ácido pirolíneo, el alquitrán vegetal, el ácido piroleñoso, el sulfato de cobre, el cloruro de zinc, el alquitrán mezclado con sebo y resina, el caucho mezclado con esencia de trementina o el bicloruro de mercurio.

A principios del siglo XIX, con el desarrollo del ferrocarril y el telégrafo, la industria de la protección de la madera evolucionó considerablemente debido a la necesidad de encontrar nuevos métodos y compuestos que evitaran la sustitución periódica de traviesas y postes. En 1831, Briant inventó el primer tratamiento por autoclave, basado en la aplicación de presión en un cilindro cerrado, sin embargo, su aplicación industrial no resultó viable. En 1839, Bethell patentó el tratamiento de autoclave de célula llena, consistente en la impregnación de la madera con soluciones protectoras utilizando la presión hidrostática o neumática y ayudándose de un vacío inicial para la extracción del aire de las células de la madera sin tratar. Posteriormente, se desarrollaron otros métodos de presión como el sistema de célula vacía o el de doble vacío. El tratamiento de la madera mediante autoclave supone el mayor avance en la industria de la protección de la madera, ya que permite la penetración profunda de los productos protectores, incluso en maderas secas de baja impregnabilidad (Peraza, 2001; Rodríguez, 1998).

A partir de la invención del tratamiento por autoclave, la investigación en esta materia se centró en la sustitución de la creosota, obtenida a partir del carbón mineral, por sales hidrosolubles más baratas, como las sales de arsénico y sales de mercurio, caracterizadas por su alta toxicidad. A principios del siglo XX se patentaron nuevos protectores a base de soluciones complejas como el Triolith, Tanalit, Trioxan o Basilit. En los años 60 se sintetizaron productos alternativos a las sales de arsénico, como las de boro o potasio, y a partir de la década de los 90 los estudios se centraron en el desarrollo de nuevos productos libres de cromo y arsénico. Actualmente, la mayoría de los estudios sobre protección de la madera se basan en la búsqueda de productos protectores de origen natural y de tamaño nanométrico (Singh & Singh, 2012), en esta línea se están desarrollando protectores de la madera basados en bionanocompuestos (BNC) o matrices formadas por polímeros naturales con un relleno inorgánico de nanopartículas dispersas (Bin *et al.*, 2011).

La forma más eficaz y económica de proteger la madera contra los agentes biológicos de degradación es mediante su impregnación con productos protectores. Estos se definen como “soluciones de materias activas con características biocidas” y deben cumplir las siguientes condiciones: poseer características biocidas, poder ser

introducidos en la madera alcanzando los grados de penetración y retención adecuados para cada caso, ser capaces de mantenerse en la madera durante un periodo de tiempo determinado y no alterar las propiedades de la madera exigidas para su uso, entre las que se encuentran el olor y color de la madera, la corrosividad de metales con los que pueda ponerse en contacto, el incremento del grado de inflamabilidad, el descenso de la resistencia de la madera y la toxicidad para los humanos y animales domésticos (Rodríguez, 1998).

La finalidad de la protección de la madera es mejorar sus prestaciones ampliando su vida útil y sus aplicaciones mediante la aplicación de tratamientos consistentes en la introducción de “una cantidad de producto protector en un volumen de madera determinado a una penetración específica”, con el fin de rellenar las paredes y el lumen celular con dicho producto para evitar su degradación por la acción de agentes bióticos (Peraza, 2001). Para asegurar la eficacia de cualquier tratamiento de protección, se deben conocer las características de la madera, los posibles agentes de deterioro en función de su lugar de instalación y ubicación geográfica, las características de los productos químicos disponibles y más eficaces en función del destino de la madera, los sistemas de aplicación de los productos protectores y los parámetros físico-químicos de impregnación de la madera (Rodríguez, 1998).

Los sistemas de tratamiento de la madera se clasifican en sistemas pasivos y activos. Los sistemas pasivos se basan en la capacidad de la madera para absorber el producto protector aplicado mediante pincelado, pulverización o inmersión breve, por lo que la impregnación de la madera es irregular y superficial. Mientras que los sistemas activos son métodos artificiales basados en la aplicación de vacío y presión para conseguir una penetración regular y profunda del producto protector (Peraza, 2001).

Otros tratamientos protectores se basan en la madera modificada o madera protegida mediante un agente químico, físico o biológico, sin necesidad de biocidas. La madera modificada presenta propiedades diferentes a las de la madera tratada de forma tradicional mediante sistemas activos o pasivos. Entre las técnicas para la obtención de madera modificada destacan el termotratamiento o modificación de las propiedades de la madera por degradación de la hemicelulosa a altas temperaturas (180 - 260°C), la acetilación o transformación de los grupos hidroxilo de la madera en grupos acetilo, mejorando la higroscopicidad de la madera, y la furfurilación o aplicación de alcohol furfúrico mediante presión, cuyo efecto también es la mejora del carácter higroscópico de la madera (Touza, 2012).

1.4 PROTECCIÓN DE LA MADERA FRENTE A HONGOS DE PUDRICIÓN MEDIANTE NANOPLATA, OLIGÓMEROS DE QUITOSANO Y PROPÓLEO

La mayoría de los productos de protección utilizados de forma tradicional son perjudiciales para el ser humano y el medio ambiente. Los daños ocasionados por la madera tratada con protectores químicos pueden producirse de forma directa, durante el tratamiento de la madera, o de forma indirecta por deslave o evaporación en madera instalada. Los principales efectos de estos productos sobre el ser humano son

irritaciones de la piel, sistema respiratorio, ojos y mucosas, reacciones alérgicas, bioacumulación en tejidos y órganos y cáncer. Por otro lado, pueden generar problemas ambientales por vertidos al suelo y a las aguas, así como emisiones accidentales a la atmósfera.

Los elementos activos presentes en los protectores químicos de madera considerados de mayor peligrosidad para el ser humano y el medio ambiente son: arsénico, cobre, cromo, benzopirenos y fenoles de la creosota, clorofenoles, elementos hidrocarbonados clorados (aldrín, dieldrín y lindano) y elementos organoestañados.

Muchos de estos productos han sido prohibidos o restringidos por su alta toxicidad a través de normativa o legislación. Por otro lado, el sector de la protección química de la madera se encuentra normalizado por el Comité Técnico de Normalización CTN-56 “Madera y Corcho”, que a su vez se encuentra integrado por seis Subcomités, entre los que se encuentra el Subcomité de Protección de la Madera SCTN-4 “Protección y Conservación de Maderas” (Rodríguez, 1998). Dentro de la normativa española de protección de madera de interés para la identificación de nuevos productos protectores de la madera frente a ataques de hongos de pudrición se encuentra la NORMA EN 113:1996: “Protectores de la madera. Métodos de ensayo para la determinación de la eficacia preventiva contra los basidiomicetos destructores de la madera. Determinación de los valores tóxicos”, en la que se especifica la metodología para la evaluación de la efectividad de productos protectores de la madera contra hongos basidiomicetes, la determinación de la cantidad de producto adecuada para la protección de la madera y la evaluación de la eficacia del producto protector (AENOR, 1996).

La tendencia actual en investigación de protectores de madera es la búsqueda de productos sin toxicidad para el ser humano y respetuosos con el medio ambiente. Entre las sustancias naturales testadas como protectores de la madera se encuentran aceites esenciales vegetales de canela, romero, tomillo, árbol del té, duramen de cedro japonés, anís y enebro, entre muchas otras especies vegetales. Extractos acículas y corteza de pino carrasco, de duramen de *Thuja plicata* Donn ex D. Don, *Chamaecyparis nootkatensis* D. Don y *Prosopis juliflora* (SW) DC, hongos del género *Trichoderma*, bacterias del género *Lactobacillus* y quitosano (Singh & Singh, 2012).

1.4.1 Nanopartículas de plata

El término nanotecnología fue descrito en 1974 como la tecnología para el desarrollo y aplicación de materiales, dispositivos y sistemas, que utiliza partículas con un tamaño entre 1 y 100 nanómetros, con nuevas propiedades y funciones derivadas de su estructura (Clausen, 2007; Mukherjee & Paria, 2013). Esta tecnología se está utilizando en diversos campos como la defensa, biomedicina, industria espacial, industria nuclear y generación de energía (Mukherjee & Paria, 2013).

Las nanopartículas metálicas presentan un tamaño y una carga diferente que los metales elementales o complejos metálicos, modificando su comportamiento y mejorando sus propiedades protectoras de la madera (Akhtari *et al.*, 2013; Clausen,

2007; Kartal *et al.*, 2009; Matsunaga *et al.*, 2009). En este sentido, se han sintetizado nuevos productos conservantes de la madera a partir de soluciones de nanopartículas de metales y óxidos metálicos, así como mediante la adición de nanopartículas metálicas a formulaciones protectoras ya existentes para mejorar sus propiedades (Nair *et al.*, 2017). Entre los nanometales estudiados como protectores de la madera se encuentran la plata, oro, cinc, cobre, óxido de hierro, boro, titanio, estaño, silicio y cerio (Clausen *et al.*, 2009; Marzbani & Mohammadnia-afrouzi, 2014; Matsunaga *et al.*, 2009; Kartal *et al.*, 2009; Shih *et al.*, 2009; Terzi *et al.*, 2016).

Clausen (2007) considera que la nanotecnología puede ser la base de la próxima generación de productos protectores de la madera, basados en conservantes sintetizados a partir nanopartículas metálicas con propiedades fungicidas (Akhtari & Arefkhani, 2013), de los que se esperan una serie de ventajas frente a los protectores tradicionales, entre las que destacan su alta estabilidad de dispersión y su baja viscosidad. Estas propiedades permiten la penetración completa y la distribución homogénea del producto en las paredes celulares, además, proporcionan un área superficial protector mayor por la formación de una capa protectora uniforme que aumenta con la disminución del tamaño de la nanopartícula. Por otro lado, los protectores de madera con nanopartículas metálicas presentan las siguientes ventajas sobre los protectores orgánicos: no se volatilizan ni degradan, por lo que no pierden su eficacia con el tiempo, y son inodoros (Akhtari & Arefkhani, 2013). Sin embargo, modifican el color de la madera tratada, siendo este más intenso con el aumento de la concentración de plata, esto se debe a que cuando los iones plata se exponen a la luz solar se reducen a metal oscureciéndose (Dorau *et al.*, 2003).

La plata es un metal antimicrobiano con un amplio espectro de actividad, considerado relativamente seguro para la salud humana y el medio ambiente. Los daños ambientales más acusados se producen sobre la fauna acuática, aunque se considera que el porcentaje de contaminación por lixiviación de la plata en las aguas subterráneas es mínimo, al quedar la mayor parte retenida en el suelo. La toxicidad de la plata contra el desarrollo de bacterias y hongos destaca sobre la de otros metales como el cobre, el cromo, el plomo, el estaño o el mercurio, mientras que su toxicidad en mamíferos es relativamente baja y no presenta actividad cancerígena para los seres humanos.

La plata metálica se oxida en presencia de humedad, liberando iones plata que inhiben la actividad microbiana de bacterias, levaduras y hongos. La velocidad de oxidación de la plata es función del tamaño de las partículas, requiriéndose partículas con un diámetro inferior a 100 nm, es decir, nanométricas, para asegurar la presencia de un área superficial protector que libere iones plata continuamente. Estos iones forman compuestos insolubles en las paredes celulares, como son los grupos sulfhidrilo, dando lugar a la pérdida de líquidos y electrolitos en los hongos xilófagos, provocando su deshidratación y muerte. Otro efecto de los iones plata en solución es la inhibición de la enzima celulasa (Dorau *et al.*, 2004). Las propiedades antibacterianas y antifúngicas de la plata han sido utilizadas en otros sectores como la medicina, la industria textil, la industria alimentaria y la construcción, en la que se están

desarrollando tableros derivados de la madera, pinturas para interiores y yesos antibacterianos implementados con nanoplatina (Dorau *et al.*, 2004; Shirakawa *et al.*, 2013; Taghiyari *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2009).

Se han desarrollado varios métodos para la síntesis de soluciones de nanoplatina, entre los que se encuentran el fotoquímico, químico, microonda, sonoquímico, métodos de reducción radioquímica con agentes reductores tóxicos como NaBH_4 , citrato o ascorbato o en una matriz de polímeros como vinilalcohol, vinilpirrolidona, polimetilmetacrilato, ácido láctico, metil vinil éter, quitosano y gelatina (Bin *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2009).

Las soluciones de nanoplatina con base de quitosano presentan un doble mecanismo de acción debido al efecto antifúngico de la nanoplatina y del quitosano (Wei *et al.*, 2009).

El tratamiento de madera con productos protectores implementados con nanopartículas de plata, cinc y cobre presentan la ventaja de aumentar las prestaciones físico-mecánicas de la madera MOR (módulo de ruptura), MOE (módulo de elasticidad) y comprensión paralela al grano debido a los enlaces químicos que se forman entre las paredes celulares y las nanopartículas (Akhtari *et al.*, 2012; Rassam, 2012).

1.4.2 Oligómeros de quitosano

El quitosano es un biopolímero aminopolisacárido lineal formado por cadenas lineales distribuidas aleatoriamente de β -(1-4) D-glucosamina (unidades desacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidades acetiladas) (Bin *et al.*, 2011) que se obtiene por desacetilación alcalina de la quitina (Figura 4 izquierda) extraída del exoesqueleto de crustáceos, paredes celulares de algunos hongos y algas (Badawy & Rabea, 2011). La principal fuente de quitina son los subproductos de la pesca (Alfredsen *et al.*, 2004).

A nivel químico, el quitosano presenta tres tipos de grupos funcionales de los que derivan sus propiedades: un grupo hidroxilo primario (C-3), un grupo hidroxilo secundario (C-6) y un grupo amino (C-2) (Figura 4 derecha) responsable del carácter quelante, floculante, así como de las funciones biológicas (Xia *et al.*, 2011).

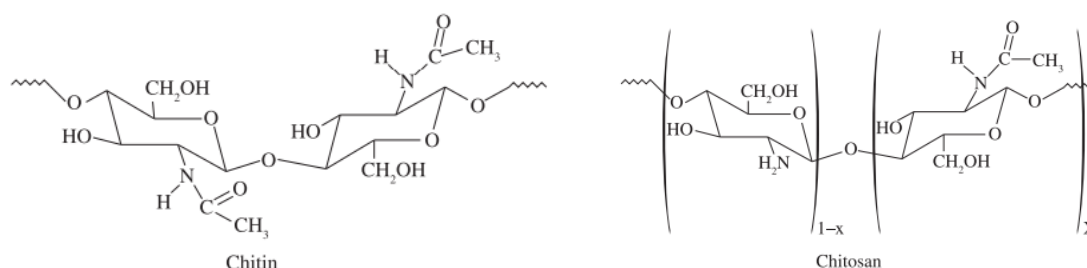


Figura 4. Estructura química de la quitina (izquierda) y del quitosano (derecha). Fuente: Goy *et al.*, (2009).

El quitosano de una base débil, insoluble en la mayoría de los solventes, pero soluble en ácidos orgánicos diluidos, como los ácidos acético, fórmico, succínico, láctico y málico (Goy *et al.*, 2009; Rabea *et al.*, 2003).

Sus propiedades antimicrobianas, su biocompatibilidad, alta biodegradabilidad, bioactividad y no toxicidad en humanos (Bin *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2011) derivan de su estructura física y biológicamente funcional. La viscosidad de las soluciones de quitosano depende de su grado de desacetilación, peso molecular, concentración, fuerza iónica, pH y temperatura (Rabea *et al.*, 2003). Por todas estas propiedades, el quitosano y sus derivados se utilizan en diversos campos como la medicina, alimentación y nutrición, farmacia, cosmética, industria química, biotecnología, agricultura, medio ambiente e industria de la madera (Wei *et al.*, 2009, Xia *et al.*, 2011).

La actividad antimicrobiana del quitosano se ha registrado sobre hongos, algas, levaduras y algunas bacterias. Esta depende de su peso molecular, grado de desacetilación, solubilidad, densidad de carga positiva, pH, concentración y capacidad quelante del quitosano, de la composición química de los nutrientes, de las condiciones ambientales y del tipo de microorganismo (Badawy & Rabea, 2011; Rabea *et al.*, 2003). En cuanto a su peso molecular, el quitosano comercial se divide en tres categorías: de bajo, medio y alto peso molecular, con pesos moleculares menores a 50 kDa, entre 50 y 150 kDa y mayores de 150 kDa, respectivamente. Diversos estudios han asociado una mayor actividad microbiana al quitosano de alto peso molecular (Alfredsen *et al.*, 2004; Goy *et al.*, 2009).

La estructura química del quitosano puede ser modificada química y enzimáticamente (Rabea *et al.*, 2003) para sintetizar otros compuestos, como los oligómeros de quitosano (pentámeros y heptámeros), que presentan un mayor carácter antifúngico (Badawy & Rabea, 2011). El quitosano actúa fungistáticamente, inhibiendo el crecimiento de hongos, y como fungicida con concentraciones altas (Alfredsen *et al.*, 2004). Rabea *et al.* (2003) observó el carácter antifúngico del quitosano sobre numerosos hongos, excepto de la mayoría de Zygomycetes, es decir, hongos que contienen quitosano como principal componente de sus paredes celulares.

La retención de las soluciones a base de quitosano en la madera depende principalmente de la interacción electrostática entre la celulosa, cargada negativamente, y la quitina, con carga positiva. Por otro lado, es función del grado de acetilación, pH, y peso molecular, presentando una mayor capacidad de penetración el quitosano con bajo peso molecular (Frederiksen, 2001).

Se han propuesto varias teorías sobre la acción antifúngica del quitosano, entre las que destacan la interacción electrostática, entre la quitina con carga positiva y los fosfolípidos cargados negativamente de las paredes celulares fúngicas, modificando la permeabilidad de la membrana celular y provocando desequilibrios osmóticos internos que acaban en plasmolisis; la inhibición de la síntesis de ARNm y proteínas responsables del crecimiento del hongo por penetración en el núcleo; la formación de una barrera externa protectora; o a la modificación morfológica de los hongos, por el aumento de la ramificación de las hifas y la reducción de su diámetro (Eikenes *et al.*, 2005; Goy *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2007).

1.4.3 Propóleo

El propóleo es una sustancia resinosa recolectada y transformada por las abejas (*Apis mellifera* L.) a partir de una mezcla de enzimas salivares, exudados de plantas y otros compuestos. El propóleo, mezclado con ceras, es utilizado por las abejas para la construcción y reparación de los panales (Burdock, 1998).

La composición química del propóleo es muy compleja y depende de la flora local y su fenología, localidad, época de recolección y especie de abeja (Ratajczak *et al.*, 2018). En general, el propóleo está formado por un 50% de resinas vegetales, un 30% de ceras, un 10% de aceites esenciales y aromáticos, un 5% de polen y un 5% de impurezas como restos minerales y vegetales. Se han llegado a registrar 300 elementos diferentes en una muestra de polen (Wóznia *et al.*, 2015b), entre los que se encuentran flavonoides, compuestos fenólicos, ésteres de ácido cinámico y derivados, ácido benzoico y derivados, alcoholes terpénicos y sesquiterpénicos, hidrocarburos, ésteres, azúcares, amino ácidos, vitaminas, macro y microelementos (Ca, Mg, Fe, F, Cu y Zn) entre otros (Walker & Crane, 1987; Woisky & Salatino, 1998; Wóznia *et al.*, 2015a).

Se han detectado compuestos, como la hidroquinona, el ácido cáustico y sus ésteres y la quercitina, con efectos cancerígenos a muy altas dosis. Mientras que otros presentan efectos antitumorales o antimicrobianos contra levaduras, mohos, bacterias y parásitos (Burdock, 1998). La mayoría de la actividad biológica del propóleo se atribuye a los compuestos fenólicos (Quiroga *et al.*, 2006).

El hombre ha explotado los productos de las abejas desde hace miles de años, utilizando el propóleo en remedios caseros debido a su carácter antiséptico, antimicótico, bacteriostático, astringente, colérico, espasmolítico, antiinflamatorio, anestésico y a sus propiedades antioxidantes. Por todas estas propiedades, el propóleo es utilizado en medicina, farmacia, odontología, alimentación, cosmética y en la industria musical como barniz (Burdock, 1998; Marcucci, 1995). El propóleo presenta una serie de propiedades idóneas para su uso como compuesto natural en los productos de protección de la madera, como es su contenido en compuestos organosilícicos (Wóznia *et al.*, 2015b). Quiroga *et al.* (2005) comprobaron la inhibición del crecimiento fúngico a partir de extractos de propóleo parcialmente purificados.

El propóleo es insoluble en agua. El propóleo balsámico o parte soluble se separa de la fracción insoluble, formada por ceras e impurezas, mediante solventes como el etanol. Se han desarrollado métodos de extracción del propóleo con solventes como la acetona, el hexano, el acetato de etilo o el alcohol metílico entre otros, siendo el más utilizado el alcohol etílico al 70 o 95%. Ambas concentraciones presentan la misma capacidad de inhibitoria del desarrollo de un gran número de hongos como *Candida albicans*, *Trichophyton cutaneum*, *Alternaria alternata*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium italicum* y *Gloeophyllum trabeum* (Burdock, 1998; Marcucci, 1995; Wóznia *et al.*, 2015c).

1.5 EL *Populus* Y SU MADERA

El género *Populus* se caracteriza por su facilidad de propagación vegetativa y rápido crecimiento. En España están presentes de forma natural las especies *Populus alba* L., *Populus tremula* L. y *Populus nigra* L. Sin embargo, la mayor parte de las choperas de reproducción están constituidas por clones.

Las plantaciones de chopo suponen menos del 1% de la superficie forestal arbolada a nivel estatal y no superan el 3% de la superficie forestal arbolada de Castilla y León. Sin embargo, representan más del 20% de la madera cortada anualmente. La superficie de choperas de producción de Castilla y León en el año 2015 fue de 44.260 ha, de las cuales el 56% pertenecían al clon *Populus x euroamericana* I-214.

La madera de chopo se ha utilizado tradicionalmente en la producción energética, pasta de papel, embalajes, entarimados, tableros derivados de la madera, carpintería ligera, paneles para la construcción o construcción de vigas, entre otros usos (Soler, 2001). En la última década se ha estudiado el comportamiento de esta madera para su utilización en productos estructurales como la madera microlaminada (LVL), debido a sus características físico-mecánicas (Tabla 1), baja densidad y buena estabilidad dimensional (Casado *et al.*, 2011). Además, la madera del Clon I-214 está clasificada bajo las clases de resistencia C18 y C14 según la norma UNE 56.544. A pesar de estas ventajas, la madera de chopo se caracteriza por su baja durabilidad al ataque de organismos xilófagos, siendo necesaria la aplicación de productos protectores de la madera para su uso (Peraza *et al.*, 2004).

Tabla 1. Características físico-mecánicas, durabilidad e impregnabilidad de la madera de chopo europeo. Fuente: (Peraza *et al.*, 2004).

Propiedades físicas	Fibra	Recta
	Grano	Fino
	Densidad (kg/m³)	420 – 480 (ligera)
	Dureza	(1,2) – 2,6 (muy blanda)
Coefficiente de contracción	Volumétrico (%)	12 – 13
	Tangencial (%)	7,4
	Radial (%)	2,8
Propiedades mecánicas	Flexión estática (N/mm²)	76 – 86,5
	Módulo de elasticidad (N/mm²)	8100 -9600
	Compresión axial (N/mm²)	29,37
	Compresión perpendicular (N/mm²)	7,8
	Cortante (N/mm²)	5,7
Durabilidad	Flexión dinámica (J/cm²)	3,8 – 4,9
		Poco durable
Impregnabilidad		Albura: Impermeable Duramen: Poco impermeable Grado inusual de variabilidad de impregnabilidad

2 OBJETIVOS

El objetivo principal del estudio es determinar la capacidad antifúngica de los tratamientos de distintas concentraciones, aplicados mediante autoclave, de nanopartículas de plata, oligómeros de quitosano y propóleo en madera de chopo frente al hongo de pudrición blanca de la madera *Trametes versicolor* (L.) Lloyd en base a la norma EN:113.

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

- Sintetizar soluciones de nanopartículas de plata 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 soluciones de oligómeros de quitosano para su empleo en la evaluación antifúngica *in vitro*.
- Sintetizar soluciones de propóleo para su empleo en la evaluación antifúngica *in vitro*.
- Comprobar la degradación de madera de *Populus* sp. por acción de *T. versicolor*.
- Valorar la eficacia antifúngica *in vitro* frente a *T. versicolor* de distintas concentraciones de nanopartículas de plata, propóleo y oligómeros de quitosano, tomados de forma aislada, en madera de *Populus* sp. impregnadas mediante autoclave.
- Obtener la concentración mínima inhibitoria, según la norma EN:113, de los compuestos sintetizados sobre el crecimiento de *T. versicolor* sobre madera de *Populus* sp.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

La metodología de evaluación de la efectividad de la acción antifúngica de los compuestos de nanoplata, oligómeros de quitosano y propóleo contra el hongo de pudrición blanca *T. versicolor* se basa en la NORMA EN 113:1996: Protectores de la madera. Métodos de ensayo para la determinación de la eficacia preventiva contra los basidiomicetes destructores de la madera. Determinación de los valores tóxicos.

El método de evaluación consiste en la impregnación total de varias series de piezas de madera de *Populus* sp. con soluciones de los tres compuestos antifúngicos con cuatro concentraciones en progresión. La impregnación de las probetas se realiza en un autoclave, alcanzando un grado de penetración del 100% (AENOR, 2008). Los valores tóxicos de los productos testados sobre *T. versicolor* se valoran por exposición *in vitro* de las muestras tratadas a dicho hongo en un medio de agar.

3.1 EQUIPOS Y COMPUESTOS QUÍMICOS

Para el desarrollo del ensayo se han utilizado los siguientes materiales y reactivos: propóleo procede de la provincia de Burgos (Cuenca del Duero), quitosano comercial de peso molecular medio (140.000-300.000 g/mol) suministrado por Hangzhou Simit

Chemical Technology, ácido acético glacial (CH₃COOH) al 2% suministrado por Panreac Quimica S.A., peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 33% p/v suministrado por Panreac Quimica S.A., nitrato de plata puro (AgNO₃) cristalizado suministrado por Quimipur, nanopartículas de plata de 20 nm de tamaño en disolución acuosa 0,02 mg/ml con citrato de sodio como estabilizador, suministrado por Aldrich Chemistry y medio de cultivo PDA (agar de patata y dextrosada) suministrado por Scharlau Microbiology.

Se han utilizado los siguientes equipos: balanza de precisión Denver Instrument AA-200 con legibilidad de 0,0001 g, agitador magnético Ibx Instruments H01 Series, estufa de cultivo "Incubat" (2000944) con una capacidad de 150 l y control de temperatura, estufa de desecación y esterilización con circulación forzada de aire Ecolan (INDELAB), autoclave de 14,5 l con bomba de presión y de vacío, espectrofotómetro Thermo Fisher Scientific Oy Ratastie 2, FI-01620, sierra de cinta Metabo 49716 Meppen, micrótopo Leica SM 2000 R, microscopio Leica DMLB y cámara para microscopio JVC TK-1280E

Entre otros materiales comunes de laboratorio cabe destacar un desecador de cristal el Simax y un autoclave para esterilización.

3.2 MATERIAL BIOLÓGICO

La norma EN:113 propone una serie de hongos para el testado de la efectividad de los protectores de la madera en función de su naturaleza. Para riesgos particulares sobre madera blanda, como es el caso del chopo, la norma define el hongo de pudrición blanca "*Trametes versicolor* (Linnaeus ex Fries) Pilat] - *Coriolus versicolor* (Linnaeus) Quélet [Synonyms: *Polyporus versicolor* Linnaeus ex Fries – *Polystictus versicolor* (Linnaeus) Saccardo".

La cepa de *T. versicolor* (20804) utilizada en el ensayo fue suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia).

3.3 CARACTERÍSTICAS Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE MADERA

Las características que debe cumplir la madera sobre la que se testan los productos antifúngicos están definidas por la norma EN:113.

Las muestras utilizadas son de *Populus x euroamericana*, caracterizada su baja dureza y su susceptibilidad al ataque de hongos de pudrición blanca.

Las dimensiones de las muestras, a partir de este punto denominadas probetas, medidas al 9±1% de humedad (m/m) fueron: 50 ± 5 mm x 25 ± 5 mm x 10 ± 5 mm, por lo que su volumen teórico fue de 12,5 mm³. La densidad media de la madera de chopo a dicha humedad fue de 0,34 g/cm³.

Las probetas se mecanizaron con los anillos de crecimiento orientados en cualquier dirección y con la dirección longitudinal paralela a la dirección de la fibra. Se mecanizó un lote inicial de aproximadamente 1.000 probetas elaboradas a partir de diferentes tablas de chopo, del que se seleccionaron el número de probetas necesarias para el

ensayo, teniendo en cuenta que estuviesen libres de grietas, manchas, putrefacción, daños por insectos u otro tipo de defecto.

Las probetas utilizadas en el ensayo se dividen en las siguientes categorías:

- **Probetas tratadas:** Seis probetas para cada tratamiento, concentración y fecha de muestreo. Son las probetas impregnadas con los diferentes tratamientos en el autoclave, y sometidas al ataque del hongo cultivado en un medio de agar durante un periodo determinado, para comprobar su eficacia.
- **Probetas no tratadas o probetas control:** Una probeta no impregnada con tratamientos antifúngicos por cada dos probetas tratadas. Se someten a un tratamiento de autoclavado con agua.

Previamente a la impregnación, las probetas se lijaron manualmente, con hojas de lija de grano medio para obtener una superficie lisa y regular, se numeraron con rotulador permanente, se pesaron en una balanza con precisión de cuatro decimales, se secaron en estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas hasta alcanzar el estado anhidro y se volvieron a pesar para determinar la masa inicial en estado anhidro. Para pesar las probetas tras el secado, se extrajeron de la estufa en grupos de aproximadamente 15 probetas y se introdujeron en un desecador para evitar la absorción de la humedad ambiental (Figura 5).

A partir de la masa inicial seca y del volumen medio de las probetas, se determinó la densidad media anhidra de la muestra.



Figura 5. De izquierda a derecha: Probetas lijadas y numeradas; estufa con las probetas del ensayo; desecador con probetas en estado anhidro; balanza de precisión.

3.4 SÍNTESIS DE PRODUCTOS ANTIFÚNGICOS

La acción fungicida y la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los productos a testar frente a *T. versicolor* fue definida por Silva-Castro *et al.* (2018). A partir de la CMI, se definieron las concentraciones de cada producto antifúngico a testar (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones de los tres productos antifúngicos a testar.

Propóleo (mg/ml)	Oligómeros de quitosano (mg/ml)	Nanoplata (ppm)
40	80	20
20	40	15
10	20	10
5	10	5

3.4.1 Preparación de las soluciones de nanoplata

La síntesis de las soluciones de nanopartículas de plata se basa en la metodología definida por Venkatesham *et al.* (2014), que utiliza una solución de quitosano como agente reductor y estabilizador de la nanoplata

Las nanopartículas de plata a base de quitosano de medio peso molecular (PM) se elaboraron de forma individual.

Para cada concentración se pesó el nitrato de plata puro cristalizado (Figura 6 derecha), se disolvió en agua destilada y se añadió la solución quitosano de 20 mg/ml 0,3 M. Las proporciones de cada compuesto que forma la solución para cada concentración se indican en la Tabla 3.

Las mezclas se autoclavaron a 121°C y 1 atm de presión durante 30 minutos, obteniendo soluciones de un color marrón metalizado que indicó la reacción se desarrolló correctamente (Figura 6 centro). La concentración de cada solución se comprobó en un espectrofotómetro UV-Vis (Figura 6 izquierda) tomando como referencia una curva de calibración ($y = 0,1037 \cdot x - 0,0823$; $r^2 = 0,99$) de nanopartículas de plata sintéticas (Sigma Aldrich, 20 nm y 0,02 mg/ml) a una longitud de onda 398 nm.

Tabla 3. Cantidad de nitrato de plata (mg) y volumen de quitosano (ml) y de agua destilada (ml) para cada concentración.

	Concentración			
	20 ppm	15 ppm	10 ppm	5 ppm
Nitrato de plata (mg)	1.000	155	150	750
Quitosano (medio PM) (ml)	20	37,5	15	37,5
Agua destilada (ml)	280	262,5	285	262,5



Figura 6. De izquierda a derecha: Nitrato de plata puro cristalizado; concentraciones de nanoplata con quitosano; espectrofotómetro UV-Vis.

3.4.2 Preparación de las soluciones de oligómeros de quitosano

Las soluciones de oligómeros de quitosano se prepararon a partir de quitosano comercial de peso molecular medio (140.000-300.000 g/mol). El método de síntesis se basó en el definido por Sun *et al.* (2007), en el que a partir de la degradación del quitosano se obtienen oligómeros de quitosano con un peso molecular de 2.000 g/mol y cadenas de carbono entre 10 y 12 monómeros.

Como solución inicial, a partir de la que se sintetizó el resto, se tomó la concentración más alta, 80 mg/ml. Esta se obtuvo por concentración de una solución de 20 mg/ml mediante evaporación por agitación continua y aplicación de calor.

La solución de concentración 20 mg/ml se elaboró añadiendo 50 g de quitosano a 2.500 ml de una solución de ácido acético al 2%. Tras elevar su temperatura a 60°C se añadieron 18,2 ml de peróxido de hidrógeno al 33% para obtener una solución final de 0,3 M mediante agitación a temperatura constante (60°C) durante aproximadamente 24 horas, cuando se disolvió todo el quitosano y la solución se tornó de un color marrón oscuro (Figura 7 centro e izquierda).

Una vez obtenida la solución inicial de 625 ml a 80 mg/ml, se reservaron 300 ml para el tratamiento con dicha concentración, y se tomaron alícuotas de la solución sobrante para la síntesis del resto de tratamientos con concentración 40 mg/ml, 20 mg/ml y 10 mg/ml (Figura 7 derecha).



Figura 7. De izquierda a derecha: Quitosano en polvo; Solución de ácido acético al 2% y quitosano en agitación; Solución de oligómeros de quitosano de concentraciones 80, 40, 20 y 10 mg/ml.

3.4.3 Preparación de las soluciones de propóleo

El propóleo puro se molió en trozos finos y se pesó una cantidad de 12,4 g para preparar una solución inicial con una concentración mayor de 40 mg/ml, a partir de la que se obtuvieron el resto de concentraciones a testar por dilución.

Los compuestos activos del propóleo se extrajeron por maceración en una solución hidroalcohólica (etanol al 44%), mediante agitación continua a temperatura ambiente durante 72 horas (Mohammadzadeh *et al.*, 2007). Posteriormente, la solución se filtró con papel filtro de 73 g/m² (11 µm) para eliminar las impurezas y las fracciones de propóleo no disueltas (Roy *et al.*, 2010).



Figura 8. De izquierda a derecha: Propóleo sólido molido; solución de etanol y propóleo en agitación sin calor; filtrado del propóleo disuelto en el etanol; solución inicial de propóleo con concentración 95,4 mg/ml.

Los extractos de propóleo se obtuvieron en una solución hidroalcohólica, en lugar de etanol puro, para obtener una solución sin trazas de cera y con una mayor cantidad de sustancias polifenólicas (Woisky y Salatino, 1988).

La concentración final de la solución stock del extracto etanólico de propóleo se obtuvo por gravimetría y equivalió a 95,4 mg/mL (Figura 8). A partir de alícuotas de la solución inicial se obtuvo un volumen de 300 ml para cada una de las concentraciones definidas: 40 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml y 5 mg/ml (Figura 9).



Figura 9. Soluciones de propóleo obtenidas por dilución de la concentración inicial de 96,4 mg/ml. De izquierda a derecha: 5 mg/ml; 10 mg/ml, 20 mg/ml y 40 mg/ml.

3.5 IMPREGNACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

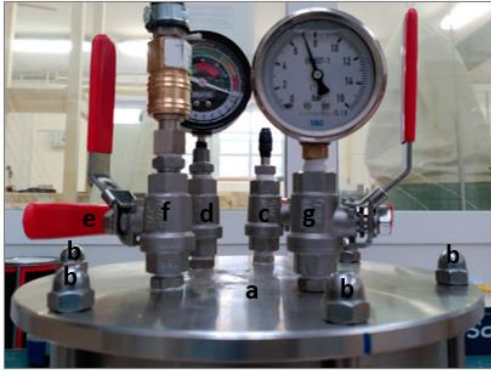
3.5.1 Autoclave y ciclo de autoclavado

El autoclave utilizado en para la impregnación total de las probetas con los diferentes tratamientos y concentraciones es un cilindro metálico de acero inoxidable cerrado herméticamente con dos tapaderas, una inferior y una superior con una serie de válvulas para realizar el vacío, introducir el tratamiento y la presión.

El autoclave consta de las siguientes partes (Figura 11):

1. **Tapa superior** de 25 cm de diámetro en cuya parte inferior interna presenta una ranura en la que se inserta una goma que encaja perfectamente con el borde superior del cuerpo del autoclave, permitiendo el cierre hermético de la unidad. La tapa superior del autoclave presenta los siguientes elementos (Figura 10):
 - a. Cuerpo de la tapa en la que se insertan las válvulas, los elementos de medida y los espárragos de cierre.
 - b. Espárragos de cierre, unen la tapa superior con la inferior evitando la apertura de la unidad debido a la sobrepresión creada durante el ciclo de presión, y creando las condiciones de hermeticidad necesarias para realizar el vacío inicial.
 - c. Válvula de vacío mediante la que se crea el vacío mediante la inserción de un tubo de goma que conecta con la bomba de vacío. Para eliminar el vacío se abre lentamente esta válvula tras retirar la goma.
 - d. Vacuómetro para la medida del vacío.

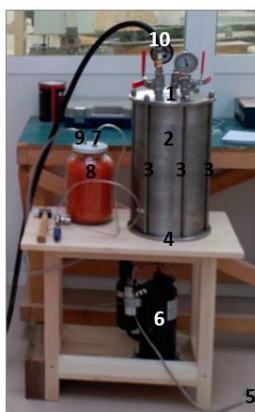
- e. Válvula de tratamiento a partir de la que se introduce el tratamiento por diferencia de presión con el exterior. En la parte inferior de la tapa está unida con un tubo de goma que conecta con el recipiente de tratamiento.
- f. Válvula de presión a la que se acopla la manguera para introducir la presión o igualar la presión a la atmosférica mediante su apertura.
- g. Manómetro para la medida de la presión en bares o kg/cm².



- a. Cuerpo de la tapa del autoclave
- b. Espárragos de cierre del autoclave
- c. Válvula de vacío
- d. Vacuómetro
- e. Válvula de presión
- f. Válvula de introducción del tratamiento
- g. Manómetro

Figura 10. Elementos de la tapa superior del autoclave.

- 2. **Cuerpo** del autoclave formado por un cilindro exterior metálico de 21,4 cm de diámetro interior y 40,5 cm de altura (sin tapas). En su interior hay un recipiente metálico de menores dimensiones y extraíble.
- 3. **Esparragos de cierre**, unen las tapas superior e inferior mediante rosca, creando las condiciones de hermeticidad necesarias para la realización del vacío inicial y evitando la apertura de la unidad durante el ciclo de presión.
- 4. **Tapa inferior**, estructura metálica de forma circular con un resalto interior en el que se acopla una goma y el cuerpo del autoclave de forma hermética.
- 5. **Toma de electricidad de la bomba de vacío.**
- 6. **Bomba de vacío**, crea el vacío en el autoclave al que está conectado a través de un tubo de goma y un bote de silicagel.
- 7. **Tubo de unión entre la bomba de vacío y el bote de silicagel.**
- 8. **Bote de silicagel**, retiene la humedad procedente del interior del autoclave, evitando la degradación de la bomba de vacío.
- 9. **Tubo de unión entre el bote de silicagel y el autoclave.**
- 10. **Manguera de presión**, une el compresor de la carpintería con la llave de presión para introducir la presión.



1. Tapa superior del autoclave
2. Cuerpo del autoclave
3. Espárragos de cierre del autoclave
4. Tapa inferior del autoclave
5. Toma de electricidad de la bomba de vacío
6. Bomba de vacío
7. Tubo de unión entre el bote de silicagel y la bomba de vacío
8. Bote con silicagel
9. Tubo de unión entre el bote de silicagel y el autoclave
10. Manguera de presión

Figura 11. Partes del autoclave.

El método de tratamiento al que se sometieron los diferentes lotes de probetas es una modificación de la norma EN:113, ya que se aplicó una presión de 6 kg/cm² durante dos horas para conseguir el grado de absorción mínimo exigido por la norma. Según esta, el rango de absorción de la madera debe oscilar entre 10 y 16 ml, sin embargo, en pruebas preliminares se comprobó que el grado de absorción de la madera de chopo con un producto antifúngico comercial aplicado mediante autoclave a presión atmosférica durante dos horas con aplicación previa de vacío, se encontraba entre los 4 y los 6 ml, mientras que con aplicación de 6 kg/cm² de presión durante dos horas y vacío previo, aumentó hasta los 8 - 10 ml.

El ciclo de autoclave para la impregnación de las probetas constó de las siguientes fases (Figura 12):

- I. Vacío inicial a 7 ± 1 kPa para extraer el aire y la humedad de la madera con el fin de mejorar la absorción de la solución.
- II. Mantenimiento del vacío durante 15 minutos.
- III. Introducción del tratamiento por diferencia de presión. Después introducción de aire hasta igualar la presión con el exterior.
- IV. Aumento de la presión hasta 6 kg/cm² para facilitar la penetración del producto (ciclo de presión).
- V. Mantenimiento de la presión durante 2 horas.
- VI. Extracción de la presión.

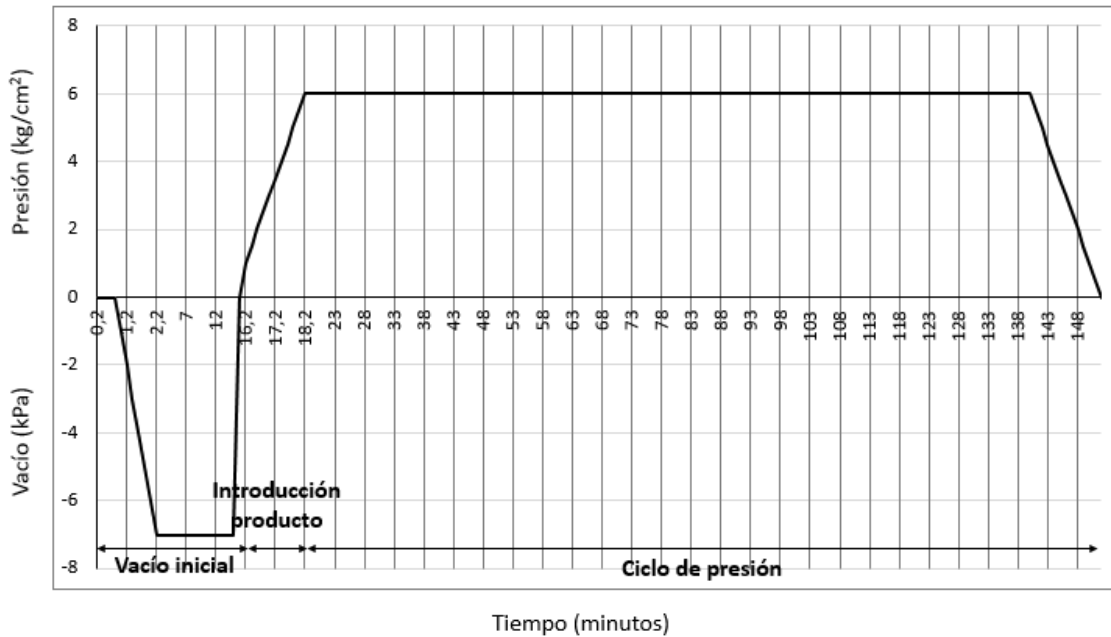


Figura 12. Ciclo del tratamiento en el autoclave.

3.5.2 Impregnación de las muestras

Los lotes de probetas se impregnaron con cada tratamiento y concentración en un autoclave siguiendo el procedimiento definido por la Norma EN:113.

1. Cada lote de probetas sometidas a un tratamiento y concentración concreto se colocó en estado anhidro en el recipiente de tratamiento de forma transversal, de forma que todas las probetas se encontraran sumergidas en el tratamiento y la mayor parte de su superficie quedara expuesta (Figura 13 izquierda).
2. Se colocó una malla plástica y un contrapeso para evitar que las probetas flotasen en la solución (Figura 13 derecha).

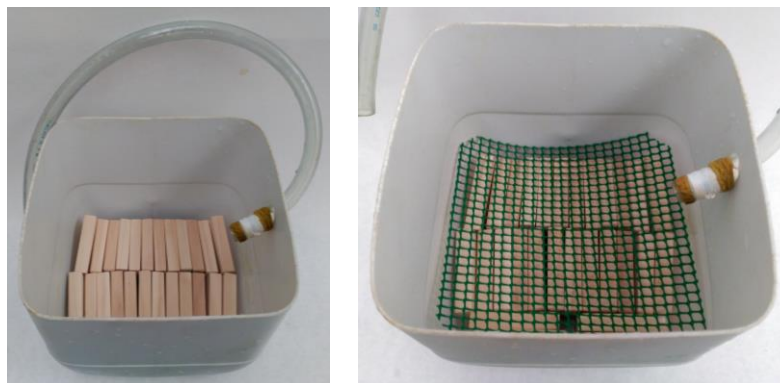


Figura 13. Probetas colocadas transversalmente en el recipiente de tratamiento (izquierda); malla de plástico para la sujeción de las probetas (derecha).

3. El recipiente con las probetas, la malla y el contrapeso se colocó dentro del cuerpo del autoclave. El tubo de conexión entre el exterior y el recipiente de las

probetas se colocó en la válvula destinada a introducir el tratamiento por diferencia de presión tras la realización el vacío.

4. Se ajustó la tapa superior al cuerpo del autoclave ajustando los espárragos con una carraca.
5. Se cerraron todas las válvulas excepto la de conexión con la bomba de presión y con el vacuómetro.
6. Se conectó el tubo de la bomba de vacío a la válvula destinada a la realización del vacío o introducción de aire, se accionó la bomba de vacío, se redujo la presión hasta los 7 ± 1 kPa, se cerró la válvula que conecta con la bomba de vacío, se retiró el tubo y se mantuvo durante 15 minutos.
7. Se conectó el tubo de introducción del tratamiento a la válvula conectada interiormente con el tubo del recipiente de tratamiento. La válvula se abrió lentamente para que el tratamiento se introdujese por diferencia de presiones (Figura 14 izquierda).
8. Se abrió la válvula de vacío para igualar la presión entre el exterior y el interior del autoclave antes de introducir la presión.
9. Se cerraron las válvulas del vacuómetro y de vacío y se abrió la del manómetro.
10. Se conectó la manguera de presión con la válvula de introducción/salida de presión (Figura 14 derecha). Esta manguera se encontraba conectada con un equipo compresor que aporta una presión máxima de 7 kg/cm^2 . Se abrió la válvula de introducción/salida de presión lentamente hasta que se alcanzó una presión de 6 kg/cm^2 , entonces se cerró la válvula y se retiró la manguera de presión. La presión se mantuvo durante 2 horas.



Figura 14. Introducción del tratamiento de quitosano de concentración 20 mg/ml (izquierda); manguera de presión conectada a llave de introducción/salida de presión y manómetro (derecha).

11. Para igualar la presión entre el interior y el exterior del autoclave se abrió lentamente la válvula de presión hasta alcanzar la presión atmosférica.
12. Las probetas se extrajeron del autoclave y se eliminó el exceso de tratamiento con papel secante (Figura 15).



Figura 15. De izquierda a derecha: Probetas tratadas con solución de nanoplata 10 ppm; probetas tratadas con quitosano 40 mg/ml.

Este proceso se repitió para cada tratamiento y concentración, teniendo en cuenta el orden ascendente de concentraciones dentro de cada tratamiento, y comenzando por el tratamiento de agua destilada de las probetas control no tratadas.

3.5.3 Estabilización de las muestras

Los lotes de probetas se mantuvieron extendidas sobre papel secante en las bancadas del laboratorio a condiciones ambientales de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura y 85% de humedad durante 10 días (Figura 16), cuando se consideró que se alcanzó la humedad de equilibrio higroscópica según experiencias de ensayos anteriores.

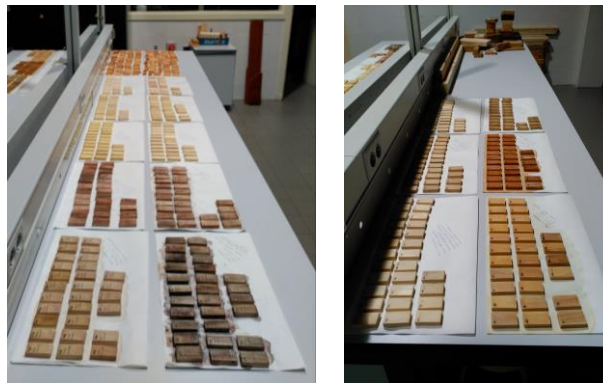


Figura 16. Lotes de probetas tratadas con diferentes tratamientos y concentraciones extendidas sobre papel secante y expuestas a condiciones de laboratorio para alcanzar la humedad de equilibrio higroscópico.

Transcurrido el periodo de estabilización de las probetas, una vez eliminado el exceso de solvente, se pesaron para determinar la cantidad de tratamiento absorbido por cada probeta como la diferencia entre la masa tras una semana de estabilización y el solvente evaporado. Este dato se calculó a partir de la Humedad de Equilibrio Higroscópico (HEH) de la madera en el laboratorio, que es del $9\pm 1\%$ según experiencias previas.

3.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FÚNGICA

La capacidad antifúngica las concentraciones de los diferentes tratamientos se evaluó mediante la introducción de dos probetas tratadas con el mismo tratamiento y

concentración, junto con un control, en un recipiente de cultivo, de polipropileno con tapa roscada con una capacidad de 150 ml sobre 3 - 4 mm de medio de cultivo inoculado con *T. versicolor*. Para evitar que las probetas entraran en contacto con el agar se colocó encima de este un soporte esterilizado consistente en una malla plástica de 1 mm de grosor. Para comparar la eficacia de los productos protectores a lo largo del tiempo se realizaron tres muestreos a lo largo de 4, 8 y 12 semanas. Además, se propuso la evaluación de un cuarto muestreo a las 16 semanas, cuyos resultados no se incluyen en este documento porque será realizado posteriormente a su redacción.

A partir de un aislado de la cepa 20804 de *T. versicolor* mantenido a 20°C se replicaron dos nuevas placas una semana antes de la inoculación de los recipientes de tratamiento. Estas se mantuvieron en una cámara de cultivo a 26°C (Figura 17 izquierda).

Se esterilizaron los recipientes de cultivo y los soportes mediante autoclave a 121°C y 1 atm de presión durante 30 minutos. Se calculó un volumen de medio de cultivo de 3 l para cubrir 3 - 4 mm en cada recipiente de cultivo. Se pesaron 117 g de PDA (Patata-Dextrosa-Agar) y se mezclaron con 3 l de agua destilada en un agitador magnético hasta que se disolvió todo el PDA. El recipiente se tapó con papel de plata, se colocó un trozo de cinta y se esterilizó mediante autoclave a 121°C y 1 atm de presión durante 30 minutos. Una vez esterilizado, se vertió el medio en cada recipiente de cultivo, se tapó y se dejó enfriar (Figura 17 medio). Una vez frío, cada recipiente de cultivo se inoculó con un cubo de 1 cm³ de agar con micelo activo de *T. versicolor* (Figura 17 derecha), se cerró parcialmente para evitar la hermeticidad y se introdujo en una cámara de cultivo a 26°C durante una semana para permitir que el hongo se desarrollara por todo el medio de cultivo.



Figura 17. De izquierda a derecha: Aislado de *T. versicolor* y dos nuevos cultivos en placa Petri; dispersión del medio en los recipientes de cultivo mediante esterilización del ambiente con mecheros Bunsen; recipiente de cultivo inoculado con un cubo de agar con *T. versicolor*.

Tras una semana en cámara, cuando el hongo se extendió por toda la superficie del agar, se introdujo el soporte (Figura 18 izquierda), dos probetas tratadas con la misma concentración y tratamiento y una probeta control (Figura 18 medio), colocada en medio de las tratadas para dificultar el crecimiento del hongo. Cada recipiente se identificó con el tratamiento, concentración, número de las probetas tratadas y número de la probeta control correspondiente, el número de muestreo se identificó con un color diferente (Figura 18 derecha). Finalmente, todos los recipientes se introdujeron

en la cámara de cultivo a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ y 80 – 88% de humedad (parámetro no controlable), siguiendo un diseño al azar (Tabla 4 y Tabla 5) para evitar diferencias de crecimiento del hongo debido a la ubicación de los recipientes dentro de la cámara.



Figura 18. De izquierda a derecha: recipiente inoculado con *T. versicolor* con soporte plástico para evitar el contacto entre las probetas y el medio de cultivo; Probetas tratadas con la misma concentración y tratamiento junto con una probeta control situada en medio; recipiente de cultivo para las probetas tratadas 237 y 238 con propóleo de concentración I junto con el control 523 correspondiente al primer muestreo.

Transcurridas 4, 8 y 12 semanas se extrajeron los recipientes de cultivo correspondientes a cada muestreo (Figura 19). Cada probeta se limpió, retirando el micelio con ayuda de un cepillo y una cuchilla, se pesó con precisión de cuatro decimales, se secó a estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ y se volvió a pesar con una precisión de cuatro decimales.

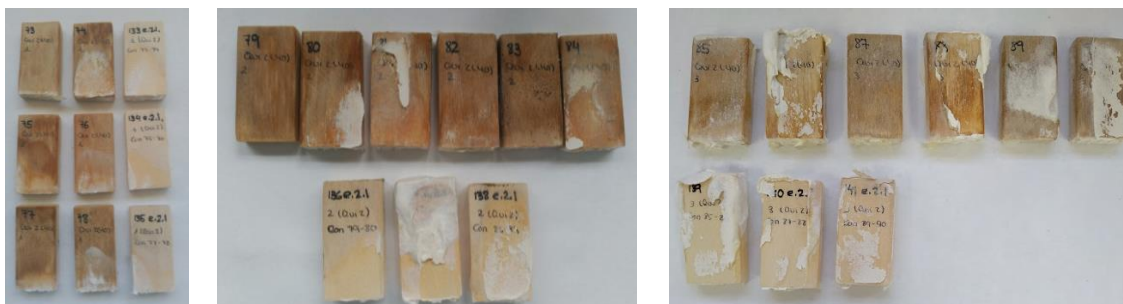


Figura 19. De izquierda a derecha: probetas tratadas con quitosano con concentración I extraídas en el primer muestreo (4 semanas), en el segundo muestreo (8 semanas) y en el tercer muestreo (12 semanas).

A partir de los pesos de las probetas tras la retirada del micelio se calculó:

- Contenido de humedad de cada probeta expresado como porcentaje de su masa seca final:

$$\text{Humedad final probeta (\%)} = \left(\frac{m_2 - m_3}{m_3} \right) \cdot 100$$

Dónde:

- m_2 : Masa tras la retirada del micelio (g).
- m_3 : Masa anhidra tras la retirada del micelio (g).

- Pérdida de masa de las probetas tratadas, sin tener en cuenta la masa correspondiente al producto protector, de las probetas control y de los controles de virulencia como la pérdida de masa como porcentaje de la masa anhidra inicial:

$$\text{Pérdida de masa probeta (\%)} = \left(\frac{m_0 - (m_3 - m_{\text{producto}})}{(m_3 - m_{\text{producto}})} \right) \cdot 100$$

Dónde:

- m_0 : Masa anhidra inicial (g).
- m_3 : Masa anhidra tras la retirada del micelio (g).
- m_{producto} : Masa retirada del producto protector calculada como la diferencia entre la masa tras una semana de estabilización y el solvente evaporado (9% HEH) (g).

Según la norma EN:113, se deben descartar aquellas probetas tratadas y control de virulencia que presentaran un porcentaje de pérdida de masa inferior al 3% y además su rango de humedad no se encuentre dentro del rango 25 – 80% o presentaban hongos diferentes a *T. versicolor*. Por otro lado, se deben descartan las muestras control con una pérdida de masa inferior a 3,75%, 7,5% y 11,25% para los muestreos 1, 2 y 3, respectivamente.

Tabla 4. Distribución aleatoria de los recipientes de cultivo en la bandeja superior de la cámara de cultivo. Pro: Tratamiento de propóleo; Qui: Tratamiento de quitosano; nAg: Tratamiento de nanoplata. Vir: Controles de virulencia. I: Concentración I; II: Concentración II; III: Concentración III; IV: Concentración IV; 1-x: Recipiente 1 del muestreo x; 2-x: Recipiente 2 del muestreo x; 3-x: Recipiente 3 del muestreo x; x-1: Muestreo 1; x-2: Muestreo 2; x-3: Muestreo 3; x-4: Muestreo 4.

		Columna								
		1	2	3	4	5	6	7	8	
Capa inferior	Fila	1	53 (Qui I 1-2)	96 (Qui IV 2-4)	25 (Pro III 1-1)	68 (Qui II 1-3)	128 (nAg IV 1-3)	135 (Vir. 2-1)	64 (Qui II 3-1)	75 (Qui III 2-1)
		2	84 (Qui III 2-4)	76 (Qui III 3-1)	137 (Vir. 1-2)	8 (Pro I 2-3)	89 (Qui IV 1-2)	95 (Qui IV 1-4)	153 (nAg II 4-2)	110 (nAg II 1-1)
		3	24 (Pro II 3-4)	90 (Qui IV 2-2)	197 (nAg IV 4-1)	74 (Qui III 1-1)	136 (Vir. 3-1)	63 (Qui II 2-1)	113 (nAg II 1-2)	1 (Pro I 1-1)
		4	48 (Pro IV 2-4)	38 (Pro IV 2-1)	37 (Pro IV 1-1)	28 (Pro III 1-2)	23 (Pro II 2-4)	78 (Qui III 2-2)	195 (Qui IV 4-3)	120 (nAg III 2-4)
		5	102 (nAg I 2-2)	184 (Qui III 4-4)	155 (nAg II 4-1)	42 (Pro IV 3-2)	46 (nAg II 3-4)	15 (Pro II 3-1)	133 (nAg IV 3-4)	13 (Pro II 1-1)
		6	175 (Qui II 4-3)	188 (nAg III 4-4)	196 (Qui IV 4-4)	182 (Qui III 4-2)	171 (Pro II 4-3)	161 (Qui I 4-1)	169 (Pro II 4-1)	159 (Pro I 4-3)
Capa media	Fila	1	72 (Qui II 2-4)	151 (nAg II 4-3)	101 (nAg I 1-2)	118 (nAg III 3-3)	16 (Pro II 1-2)	107 (nAg I 1-4)	142 (Vir. 3-3)	26 (Pro III 2-1)
		2	31 (Pro III 1-3)	41 (Pro IV 2-2)	130 (nAg IV 3-3)	81 (Qui III 2-3)	77 (Qui III 1-2)	29 (Pro III 2-2)	180 (Pro III 4-4)	99 (nAg I 2-1)
		3	86 (Qui IV 1-1)	69 (Qui II 2-3)	85 (Qui III 3-4)	98 (nAg I 1-1)	2 (Pro I 2-1)	62 (Qui II 1-1)	20 (Pro II 2-3)	156 (nAg II 1-3)
		4	112 (nAg II 3-1)	5 (Pro I 2-2)	14 (Pro II 2-1)	73 (Qui II 3-4)	138 (Vir. 2-2)	88 (Qui IV 3-1)	51 (Qui I 2-1)	140 (Vir. 1-3)
		5	83 (Qui III 1-4)	79 (Qui III 3-2)	126 (nAg IV 2-2)	115 (nAg II 3-2)	35 (Pro III 2-4)	18 (Pro II 3-2)	56 (Qui I 1-3)	57 (Qui I 2-3)
		6	189 (Pro IV 4-1)	183 (Qui III 4-3)	164 (Qui I 4-4)	177 (Pro III 4-1)	174 (Qui II 4-2)	103 (nAg I 3-2)	179 (Pro III 4-3)	193 (Qui IV 4-1)
Capa superior	Fila	1	66 (Qui II 2-2)	131 (nAg IV 1-4)	9 (Pro I 3-3)	54 (Qui I 2-2)	91 (Qui IV 3-2)	70 (Qui II 3-3)	117 (nAg III 2-3)	71 (Qui II 1-4)
		2	39 (Pro IV 3-1)	141 (Vir. 2-3)	49 (Pro IV 3-4)	124 (nAg IV 3-1)	10 (Pro I 1-4)	59 (Qui I 1-4)	60 (Qui I 2-4)	148 (nAg II 4-4)
		3	143 (Vir. 1-4)	181 (Qui III 4-1)	109 (nAg I 3-4)	108 (nAg I 2-4)	50 (Qui I 1-1)	178 (Pro III 4-2)	100 (nAg I 3-1)	30 (Pro III 3-2)
		4	27 (Pro III 3-1)	11 (Pro I 2-4)	121 (nAg III 3-4)	80 (Qui III 1-3)	125 (nAg IV 1-2)	186 (nAg III 4-2)	199 (nAg IV 4-3)	67 (Qui II 3-2)
		5	17 (Pro II 2-2)	149 (nAg II 3-3)	82 (Qui III 3-3)	116 (nAg III 1-3)	58 (Qui I 3-3)	134 (Vir. 1-1)	105 (nAg I 2-3)	92 (Qui IV 1-3)
		6	163 (Qui I 4-3)	160 (Pro I 4-4)	172 (Pro II 4-4)	168 (nAg I 4-4)	185 (nAg III 4-1)	194 (Qui IV 4-2)	190 (Pro IV 4-2)	165 (nAg I 4-1)

Tabla 5. Distribución aleatoria de los recipientes de cultivo en la bandeja inferior de la cámara de cultivo. Pro: Tratamiento de propóleo; Qui: Tratamiento de quitosano; nAg: Tratamiento de nanoplata. Vir: Controles de virulencia. I: Concentración I; II: Concentración II; III: Concentración III; IV: Concentración IV; 1-x: Recipiente 1 del muestreo x; 2-x: Recipiente 2 del muestreo x; 3-x: Recipiente 3 del muestreo x; x-1: Muestreo 1; x-2: Muestreo 2; x-3: Muestreo 3; x-4: Muestreo 4.

		Columna							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Capa inferior	1	3 (Pro I 3-1)	40 (Pro IV 1-2)	7 (Pro I 1-3)	93 (Qui IV 2-3)	12 (Pro I 3-4)	176 (Qui II 4-4)	21 (Pro II 3-3)	3 (Pro I 3-1)
	2	157 (Pro I 4-1)	52 (Qui I 3-1)	43 (Pro IV 1-3)	119 (nAg III 1-4)	152 (nAg II 1-4)	150 (nAg II 2-3)	44 (Pro IV 2-3)	157 (Pro I 4-1)
	3	111 (nAg II 2-1)	6 (Pro I 3-2)	33 (Pro III 3-3)	122 (nAg IV 1-1)	145 (Vir. 3-4)	34 (Pro III 1-4)	132 (nAg IV 2-4)	111 (nAg II 2-1)
	4	129 (nAg IV 2-3)	94 (Qui IV 3-3)	123 (nAg IV 2-1)	170 (Pro II 4-2)	19 (Pro II 1-3)	36 (Pro III 3-4)	187 (nAg III 4-3)	129 (nAg IV 2-3)
	5	97 (Qui IV 3-4)	32 (Pro III 2-3)	65 (Qui II 1-2)	61 (Qui I 3-4)	22 (Pro II 1-4)	45 (Pro IV 3-3)	114 (nAg II 2-2)	97 (Qui IV 3-4)
	6	106 (nAg I 3-3)	167 (nAg I 4-3)	191 (Pro IV 4-3)	173 (Qui II 4-1)	198 (nAg IV 4-2)	166 (nAg I 4-2)	158 (Pro I 4-2)	106 (nAg I 3-3)
Capa media	1								
	2	127 (nAg IV 3-2)	87 (Qui IV 2-1)						
	3	162 (Qui I 4-2)	139 (Vir. 3-2)						
	4	4 (Pro I 1-2)	104 (nAg I 1-3)						
	5	144 (Vir. 2-4)	200 (nAg IV 4-4)						
	6	192 (Pro IV 4-4)							
Capa superior	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	6								

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Según la norma EN:113, solo se analizan los datos de aquellos lotes en los que al menos tres muestras han sido aceptadas. En este ensayo, todas las probetas fueron aceptadas para todos los lotes. A partir de estos datos se realizaron los cálculos estadísticos con el software R 3.5.0 para Windows (The R Development Core Team, 2018).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

En este apartado se presenta el conjunto total de datos del porcentaje de pérdida de masa de la madera tratada para tres tratamientos con diferentes productos protectores, cuatro concentraciones diferentes de cada uno de ellos y tres tiempos de exposición (Muestreo) al ataque de *T. versicolor*. Junto a ellos se incluyen los valores obtenidos en las muestras control, sin tratamiento, y que son utilizadas para contrastar la efectividad de cada tratamiento.

En una primera aproximación se puede apreciar cómo, en los tres muestreos, las diferentes concentraciones de propóleo parecen no haber protegido a la madera de la degradación por *T. versicolor*, mientras que los tratamientos de oligómeros de quitosano y nanoplata parecen haber protegido a la madera del ataque del hongo, siendo similar la acción protectora de todas las concentraciones de nanoplata, mientras en el tratamiento con oligómeros de quitosano se observa una menor degradación de la madera en la concentración más alta (80 mg/ml).

4.1.1 Muestreo 1

El muestreo 1 se realizó a las 4 semanas de la inoculación de las probetas tratadas con las diferentes concentraciones y tratamientos, así como de las probetas control. En este primer muestreo cabía esperar resultados no concluyentes, debido a que la norma EN:113 define que el tiempo que deben permanecer las probetas expuestas al hongo es de 16 semanas.

La pérdida de masa de las probetas tratadas con las tres concentraciones más bajas de propóleo (5, 10 y 20 mg/ml) siguieron una tendencia decreciente a medida que aumentó la concentración, sin embargo, este efecto no pareció observarse en la concentración más alta (40 mg/ml) (Figura 20 izquierda). Por otro lado, la pérdida de masa de las probetas de la concentración 10 mg/ml fue similar que la de los controles, no siendo así para los tratamientos de 5, 15 y 20 mg/ml.

En el caso de los tratamientos con oligómeros de quitosano pareció observarse un efecto protector con el aumento de la concentración de quitosano, siendo la pérdida de masa en todas las concentraciones inferior a la de los controles (Figura 20 medio).

El tratamiento con nanoplata pareció proteger a la madera independiente de la concentración, ya que la pérdida de masa fue similar para las cuatro concentraciones y en todos los casos fue menor que la pérdida de masa de los controles (Figura 20 derecha).

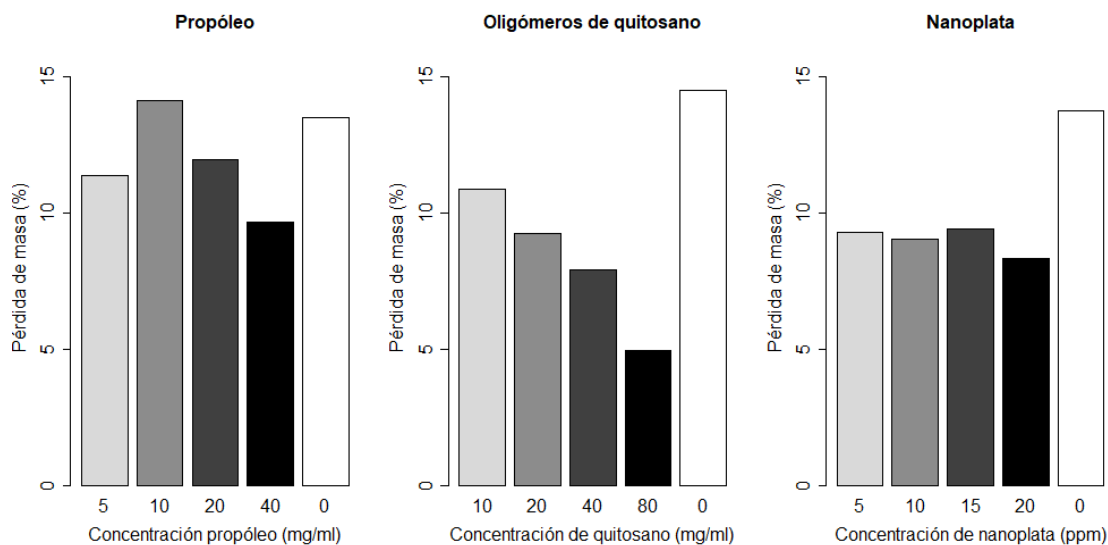


Figura 20. Porcentaje de pérdida de masa para las concentraciones y el control (concentración 0) de los tratamientos de propóleo, oligómeros de quitosano y nanoplata para el primer muestreo 1.

En la Tabla 6 se recogen los valores estadístico descriptivos para todas las concentraciones de los diferentes tratamientos aplicados en el primer muestreo. La pérdida de masa para la mayoría de las probetas tratadas con las diferentes concentraciones de propóleo fue mayor que para aquellas tratadas con diferentes concentraciones de oligómeros de quitosano y nanoplata, por lo que el propóleo parece ofrecer una menor protección de la madera. En los tratamientos de propóleo solamente pareció apreciarse un efecto protector antifúngico para la concentración más alta (9,6%), ya que el resto presentaron altas pérdidas de masa de 14,1%, 11,9% y 11,3%, para las concentraciones de 10, 20 y 5 mg/ml, respectivamente. No observándose un aumento del efecto protector del producto con el aumento de la concentración.

Por el contrario, el tratamiento con oligómeros de quitosano pareció ofrecer una mayor protección a medida que aumentó su concentración, ya que se pasó progresivamente de una pérdida de masa de 10,8%, en el tratamiento con menor concentración (10 mg/ml), a 4,9% en el tratamiento con mayor concentración (80 mg/ml).

Finalmente, las diferentes concentraciones de nanoplata presentaron una pérdida de peso muy similar, entre 9,0 y 9,4%, y en todos los casos bastante inferior a la de los controles (13,7%).

Esta primera apreciación de los datos descriptivos del primer muestreo parece mostrar el efecto protector de los oligómeros de quitosano y de la nanoplata contra los hongos de pudrición blanca.

Tabla 6. Número de muestra, IC de la Media, desviación estándar y coeficiente de variación para cada concentración por tratamiento del muestreo 1 y sus respectivos controles (concentración 0).

Tratamiento	Concentración	Valores estadísticos para la pérdida de masa			
		n	IC de la Media	Desviación estándar	Coficiente de variación
Propóleo (mg/ml)	5	6	11,380±1,051	1,488	0,131
	10	6	14,159±0,970	1,370	0,097
	20	6	11,983±0,659	0,938	0,078
	40	6	9,692±0,408	0,601	0,062
	0	12	13,517±1,327	2,500	0,185
Oligómeros de quitosano (mg/ml)	10	6	10,882±1,971	2,820	0,259
	20	6	9,269±0,842	1,180	0,127
	40	6	7,907±0,930	1,252	0,158
	80	6	4,981±0,637	0,896	0,180
	0	12	14,536±1,830	3,428	0,236
Nanoplata (ppm)	5	6	9,302±0,082	0,124	0,013
	10	6	9,041±0,048	0,070	0,008
	15	6	9,434±0,305	0,493	0,052
	20	6	8,327±0,186	0,264	0,032
	0	12	13,750±1,089	2,002	0,146

4.1.2 Muestreo 2

El muestreo 2 se realizó a las 8 semanas de inocular las probetas con el hongo.

Para el tratamiento con propóleo, la protección de la madera no pareció mejorar con el paso del tiempo, ya que la pérdida de masa de todas las concentraciones fue mayor que en el muestreo 1, y en el caso de las concentraciones más bajas (5 y 10 mg/ml) la pérdida de peso fue superior a la de los controles. Sin embargo, se siguió observando una mayor capacidad protectora para la concentración más alta (40 mg/ml) (Figura 21 izquierda).

El tratamiento con oligómeros de quitosano presentó un efecto protector sobre la madera, ya que para todas las concentraciones la pérdida de masa fue menor que la de los controles. Sin embargo, el efecto protector de las concentraciones de 10, 20 y 40 mg/ml pareció degradarse con el paso del tiempo, ya que se pasó de observarse una tendencia protectora con el aumento de la concentración en el muestreo 1, a perder la misma cantidad de masa en los tres casos. Por otro lado, la concentración más alta pareció presentar una capacidad protectora mayor que el resto (Figura 21 medio).

En el caso de los tratamientos con nanoplata se siguió observando una pérdida de masa similar para todas las concentraciones y con valores similares a los del muestreo 1. Además, para todas ellas la pérdida de peso fue muy inferior a la sufrida por los controles, siendo esta superior que en el muestreo 1 (Figura 21 derecha).

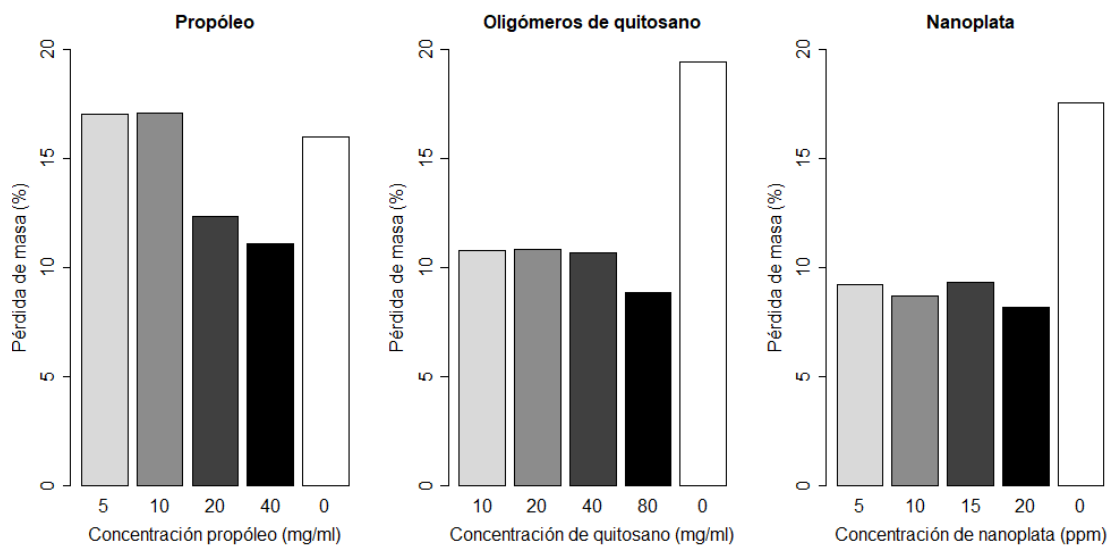


Figura 21. Porcentaje de pérdida de masa para las concentraciones y el control (concentración 0) de los tratamientos de propóleo, oligómeros de quitosano y nanoplata para el primer muestreo 2.

La estadística descriptiva para el muestreo 2 se recoge en la Tabla 7. Como en el muestreo 1 el propóleo pareció ofrecer una menor protección que el resto de tratamientos, sobre todo en las concentraciones más bajas (5 y 10 mg/ml) en las que la pérdida de masa (17,0%) fue mayor que la de sus respectivos controles (16,0%), no siendo así para las concentraciones más altas de 20 y 40 mg/ml, en las que se observó un aumento de la protección con la concentración, por presentar una pérdida de masa del 12,3% y del 11,1%, respectivamente.

El tratamiento con oligómeros de quitosano para las concentraciones de 10, 20 y 40 mg/ml pareció haber perdido el efecto protector en función del aumento de la concentración observado en el muestreo 1, ya que para estas tres concentraciones la pérdida de peso osciló entre 10,7 y 10,8%. El carácter protector de los oligómeros de quitosano siguió siendo patente para la concentración más alta de 80 mg/ml, con una pérdida de masa inferior (8,8%).

El porcentaje de pérdida de masa las concentraciones de nanoplata fue muy similar que en el muestreo 1, oscilando entre 8,2 - 9,3%, sin embargo, la pérdida de masa de los controles aumentó hasta el 17,5%.

Tabla 7. Número de muestra, IC de la Media, desviación estándar y coeficiente de variación para cada concentración por tratamiento del muestreo 2 y sus respectivos controles (concentración 0).

Tratamiento	Concentración	Valores estadísticos para la pérdida de masa			
		n	IC de la Media	Desviación estándar	Coeficiente de variación
Propóleo (mg/ml)	5	6	17,037±2,378	3,374	0,198
	10	6	17,083±1,056	1,593	0,093
	20	6	12,354±1,652	2,327	0,188
	40	6	11,115±0,898	1,237	0,111
	0	12	16,010±2,507	4,694	0,293
Oligómeros de quitosano (mg/ml)	10	6	10,815±0,951	1,099	0,102
	20	6	10,850±2,056	2,755	0,254
	40	6	10,709±1,051	1,476	0,138
	80	6	8,851±2,016	2,932	0,331
	0	12	19,433±3,616	6,557	0,337
Nanoplata (ppm)	5	6	9,210±0,108	0,149	0,016
	10	6	8,728±0,035	0,050	0,006
	15	6	9,342±0,297	0,421	0,045
	20	6	8,209±0,179	0,270	0,033
	0	12	17,549±2,220	4,177	0,238

4.1.3 Muestreo 3

El muestreo 3 se realizó a las 12 semanas de la inoculación de las probetas con el hongo.

En el caso del propóleo se confirmó que el paso del tiempo no mejora la protección de la madera, ya que la pérdida de masa de las diferentes concentraciones fue muy similar entre sí y con la pérdida de masa de los controles, incluso mayores que estos en el caso de las concentraciones de 10 y 20 mg/ml. Como en los muestreos anteriores se siguió observando que la concentración más alta (40 mg/ml) pareció ejercer una mayor protección (Figura 22 izquierda).

En el caso del tratamiento con oligómeros de quitosano la pérdida de masa de las diferentes concentraciones siguió siendo menor que la de los controles, demostrando su efecto protector, sobre todo para la concentración más alta (80 mg/ml). Sin embargo, como en el muestreo 2, se observó que las concentraciones de 10, 15 y 20 mg/ml presentaron una pérdida de masa similar, pero en este caso, mayor a medida que aumentó la concentración (Figura 22 medio), efecto contrario al observado en el muestreo 1.

Los tratamientos con nanoplata siguieron presentando una pérdida de masa similar para todas las concentraciones y con valores similares a los de los muestreos 1 y 2. Además, para todas ellas, la pérdida de peso fue muy inferior a la pérdida de masa de los controles, siendo esta superior que en muestreos anteriores (Figura 22 derecha).

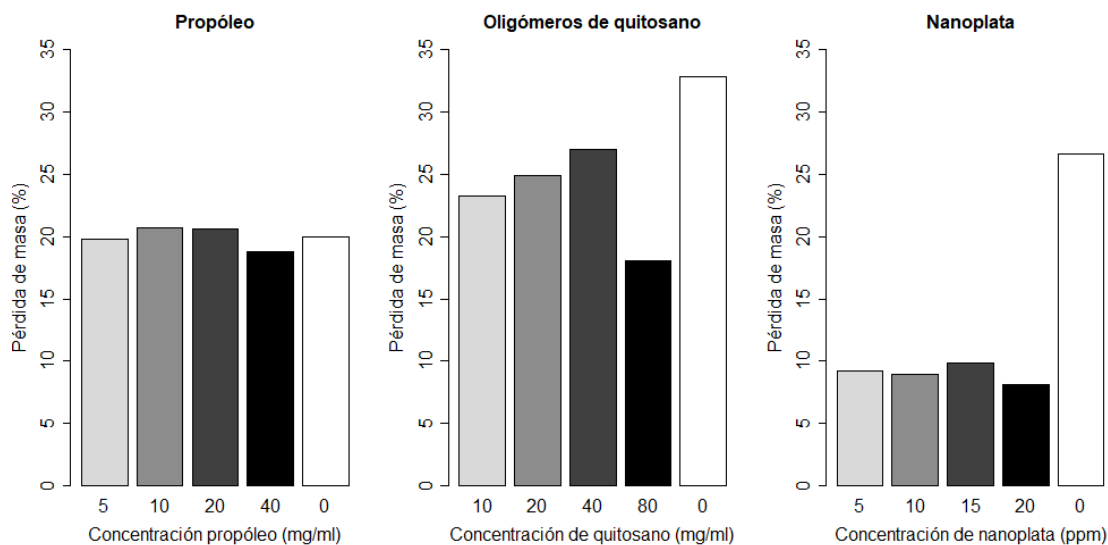


Figura 22. Porcentaje de pérdida de masa para las concentraciones y el control (concentración 0) de los tratamientos de propóleo, oligómeros de quitosano y nanoplata para el primer muestreo 3.

En la Tabla 8 se recogen los valores de la estadística descriptiva para el muestreo 3. La tendencia de las concentraciones del tratamiento de propóleo siguió siendo similar a la de los muestreos anteriores, observándose una pérdida de peso menor para la concentración más alta (18,7%) pero muy similar para las concentraciones de 5, 10 y 15 mg/ml (19,8 - 20,7%), y mayor que la observada en los controles (19,9%) en el caso de las concentraciones de 10 y 20 mg/ml.

Todos los valores de pérdida de masa para las concentraciones con oligómeros de quitosano fueron inferiores que en el caso de los controles (32,8%), observándose una mayor protección en las concentraciones más altas de 40 y 80 mg/ml, en las que las pérdidas de masa fueron del 27,0 y 18,7%, respectivamente.

El carácter protector del tratamiento con nanoplata siguió siendo similar al de los muestreos anteriores, con una pérdida de masa para todas las concentraciones de 8,1 – 9,8%, aumentando la pérdida de masa de los controles hasta 26,6%.

Tabla 8. Número de muestra, IC de la media, desviación estándar y coeficiente de variación para cada concentración por tratamiento del muestreo 3 y sus respectivos controles (concentración 0).

Tratamiento	Concentración	Valores estadísticos para la pérdida de masa			
		n	IC de la Media	Desviación estándar	Coficiente de variación
Propóleo (mg/ml)	5	6	19,842±1,970	2,669	0,201
	10	6	20,706±2,089	3,187	0,135
	20	6	20,630±2,926	4,140	0,154
	40	6	18,788±1,822	2,665	0,201
	0	12	19,953±2,799	5,342	0,268

Tabla 8 (Cont.). Número de muestra, IC de la media, desviación estándar y coeficiente de variación para cada concentración por tratamiento del muestreo 3 y sus respectivos controles (concentración 0).

Tratamiento	Concentración	Valores estadísticos para la pérdida de masa			
		n	IC de la Media	Desviación estándar	Coficiente de variación
Oligómeros de quitosano (mg/ml)	10	6	23,249±1,945	2,821	0,142
	20	6	24,908±4,960	7,109	0,121
	40	6	27,041±4,462	7,976	0,285
	80	6	18,107±6,345	8,979	0,295
	0	12	32,855±2,519	4,819	0,147
Nanoplata (ppm)	5	6	9,175±0,121	0,175	0,496
	10	6	8,921±0,115	0,163	0,019
	15	6	9,827±0,469	0,671	0,018
	20	6	8,122±0,188	0,284	0,068
	0	12	26,688±2,638	4,948	0,185

4.2 ESTADÍSTICA COMPARATIVA

Los datos estadísticos se trataron por grupos en función de su concentración, tratamiento preservante y muestreo. Para cada grupo de datos de las concentraciones de los tratamientos nanoplata (Tabla 9), oligómeros de quitosano (Tabla 10) y propóleo (Tabla 11), se estudió la normalidad y la homocedasticidad con el fin de definir los Test estadísticos más adecuados para llevar a cabo las comparaciones y el establecimiento de los grupos homogéneos en cada uno de ellos.

El estudio de normalidad se realizó mediante el Test de Saphiro Wilk, ya que es adecuado para poblaciones pequeñas ($n < 30$). Se consideró que un grupo de datos sigue una distribución normal cuanto su p-valor es mayor que el nivel de significación 0,05.

El estudio de homocedasticidad, es decir, de la procedencia de las muestras de poblaciones con la misma variabilidad, expresada ésta como la varianza, se llevó a cabo mediante el test de Bartlett cuando el grupo de datos siguió una distribución normal, o mediante el test de Levene cuando no la siguió, ya que este test es menos sensible a la desviación de la normalidad. En ambos casos, se consideró que todas las muestras presentaron homocedasticidad o igualdad de varianza cuando $p - \text{valor} > 0,05$.

En caso de que las muestras presentaran la misma varianza se aplicó el test Anova, mientras que si existió diferencia de varianzas se aplicó el test de Welch. La hipótesis nula de igualdad de medias se rechazó cuando $p - \text{valor} < 0,05$, aplicándose un test posthoc, en este caso el Test de Tukey, para comprobar las diferencias dos a dos entre grupos. En caso contrario, $p > 0,05$, se acepta que no existe diferencia entre los grupos.

4.2.1 Tratamientos con nanoplata

En los tratamientos con diferentes concentraciones de nanoplata se observó, en los tres muestreos, que en la pérdida de masa de la concentración más elevada (20 ppm) fue significativamente diferente de la del resto de concentraciones. En el muestreo 1, las concentraciones de 5, 10 y 15 ppm no presentaron diferencias significativas entre sí, pero sí con la concentración de 40 ppm (Figura 23 izquierda). En el muestreo 2, la pérdida de masa de las concentraciones de 5 y 15 ppm fueron significativamente similares entre sí, pero diferente de la de las concentraciones de 10 y 20 ppm, que a su vez fueron significativamente diferentes entre sí (Figura 23 medio). Por último, en el muestreo 3, se observó que las dos concentraciones más bajas presentaron un porcentaje de pérdida de masa similar entre sí, pero significativamente diferente que el de las concentraciones más altas, que a su vez, fueron significativamente diferentes entre sí (Figura 23 derecha).

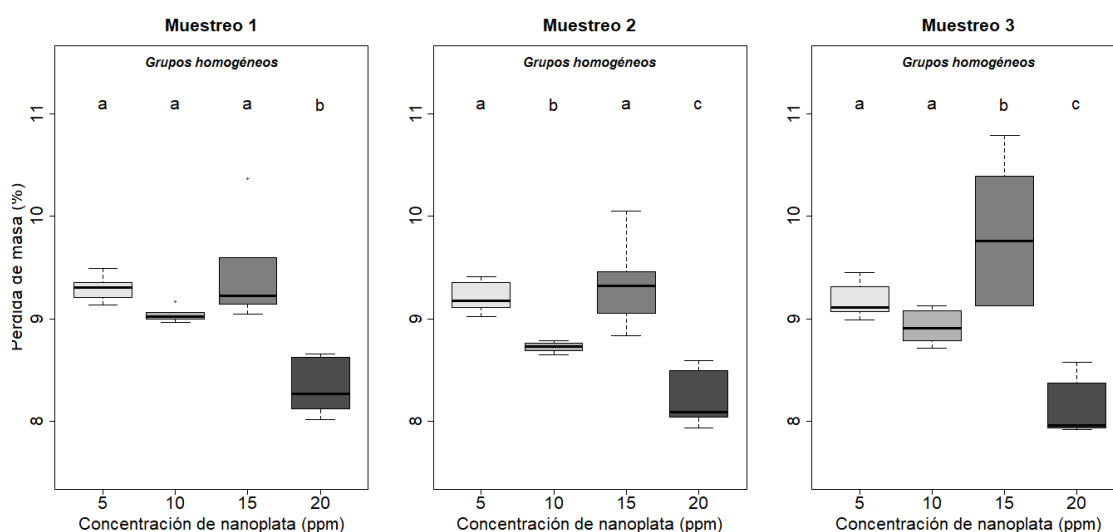


Figura 23. Pérdida de masa (%) y grupos homogéneos para cada concentración del tratamiento con nanoplata para los tres muestreos.

En la Tabla 9 se recogen los resultados de la estadística comparativa para los tratamientos con nanoplata para cada concentración y muestreo.

Tabla 9. Normalidad (p -valor del Test de Shapiro), homocedasticidad (p – valor del Test de Barlett) y comparación del p - valor con el test más adecuado para cada caso, en función del cumplimiento de la homocedasticidad y normalidad, y grupos homogéneos para cada concentración del tratamiento con nanoplata.

Muestreo	Concentración nanoplata (mg/ml)	Norm p-valor Test de Shapiro	Homkd p-valor (Test)	Comparación p-valor (Test)	Grupos homogéneos
1	5	0,959	0,00078 (Bartlett)	0,0001286 (Welch)	a
	10	0,481			a
	15	0,047			a
	20	0,389			b

Tabla 9 (Cont.). Normalidad (p -valor del Test de Shapiro), homocedasticidad (p – valor del Test de Barlett) y comparación del p - valor con el test más adecuado para cada caso, en función del cumplimiento de la homocedasticidad y normalidad, y grupos homogéneos para cada concentración del tratamiento con nanoplata.

Muestreo	Concentración nanoplata (mg/ml)	Norm p-valor Test de Shapiro	Homkd p-valor (Test)	Comparación p-valor (Test)	Grupos homogéneos
2	5	0,691	0,00123 (Bartlett)	7,256 · 10 ⁻⁵ (Welch)	a
	10	0,951			b
	15	0,716			a
	20	0,144			c
3	5	0,397	0,00522 (Bartlett)	9,045 · 10 ⁻⁵ (Welch)	a
	10	0,740			a
	15	0,522			b
	20	0,022			c

4.2.2 Tratamientos con oligómeros de quitosano

Las concentraciones de oligómeros de quitosano parecieron seguir un patrón de protección de la madera con el aumento de la dosis de producto durante el muestreo 1. El porcentaje de pérdida de masa fue significativamente igual entre las dos concentraciones más bajas (10 y 20 mg/ml) y entre las concentraciones de 20 y 40 mg/ml, siendo el porcentaje de pérdida de masa de la dosis más alta (80 mg/ml) significativamente diferente de la del resto de tratamientos (Figura 24 izquierda). En el segundo y tercer muestreo, las diferencias de pérdida de masa para todas las concentraciones fueron significativamente similares, dejando de observarse la tendencia protectora del producto con el aumento de la concentración (Figura 24 medio y derecha).

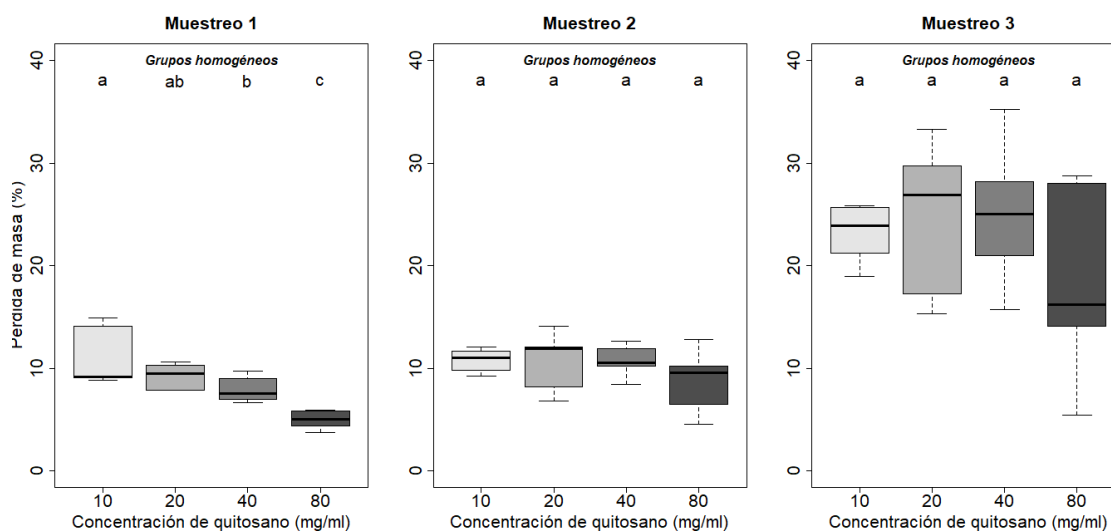


Figura 24. Pérdida de masa (%) y grupos homogéneos para cada concentración del tratamiento con oligómeros de quitosano para los tres muestreos.

En la Tabla 10 se recogen los resultados de la estadística comparativa para los tratamientos con oligómeros de quitosano para cada concentración y muestreo.

Tabla 10. Normalidad (p -valor del Test de Shapiro), homocedasticidad (p – valor del Test de Barlett) y comparación del p - valor con el test más adecuado para cada caso, en función del cumplimiento de la homocedasticidad y normalidad, y grupos homogéneos para cada concentración del tratamiento con oligómeros de quitosano.

Muestreo	Concentración quitosano (mg/ml)	Norm p-valor Test de Shapiro	Homkd p-valor (Test)	Comparación p-valor (Test)	Grupos homogéneos
1	10	0,008	0,05310 (Bartlett)	0,00006750 (Anova)	a
	20	0,343			a b
	40	0,340			b
	80	0,298			c
2	10	0,765	0,13490 (Bartlett)	0,65100000 (Anova)	a
	20	0,309			a
	40	0,787			a
	80	0,850			a
3	10	0,273	0,1581 (Bartlett)	0,27500000 (Anova)	a
	20	0,382			a
	40	0,985			a
	80	0,490			a

4.2.3 Tratamientos con propóleo

Las diferentes concentraciones de propóleo para los tres muestreos no parecieron seguir un patrón protector marcado por el aumento de la dosis de producto. En el primer y tercer muestreo (Figura 25 izquierda y derecha), se observó que la concentración más baja (5 mg/ml) presentó un porcentaje de pérdida de masa significativamente igual a la de las concentraciones de 20 mg/ml en el muestreo 1 y de 40 mg/ml en el muestreo 2, mientras que con la segunda concentración más baja (15 mg/ml) presentó diferencias significativas en ambos muestreos. En el muestreo 2 (Figura 25 medio) se observó una tendencia por concentraciones, presentando las dos más bajas (5 y 10 mg/ml) pérdidas de masa similares entre sí pero significativamente diferentes de la pérdida de masa de las concentraciones más altas (20 y 40 mg/ml), que a su vez, no mostraron diferencias significativas entre ellas. Finalmente, en el muestreo 3, no se observaron diferencias significativas de pérdida de masa entre la menor (5 mg/ml) y las dos concentraciones mayores (20 y 40 mg/ml).

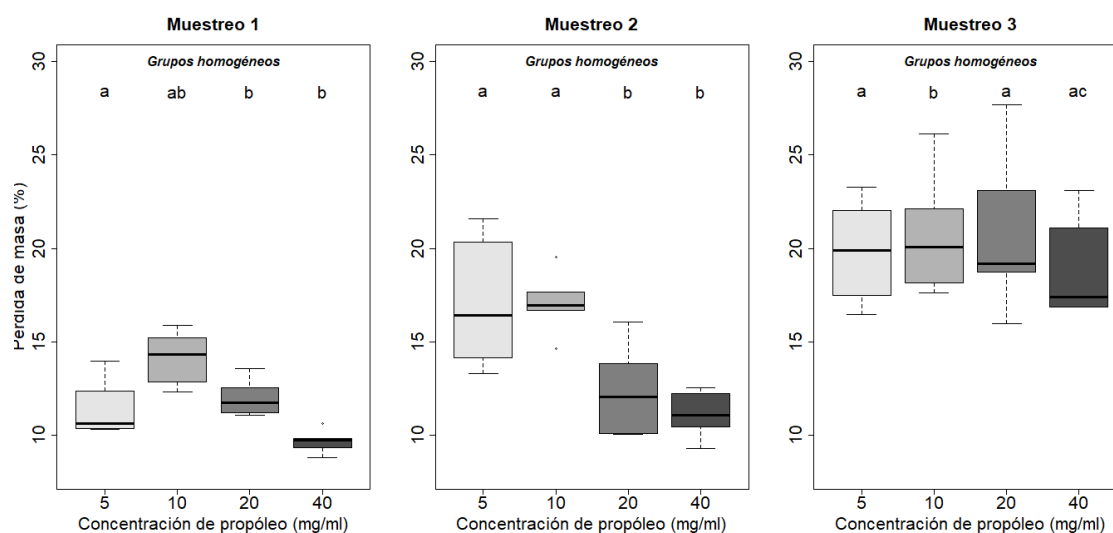


Figura 25. Pérdida de masa (%) y grupos homogéneos para cada concentración del tratamiento con propóleo para los tres muestreos.

En la Tabla 11 se recogen los resultados de la estadística comparativa para los tratamientos con propóleo para cada concentración y muestreo.

Tabla 11. Normalidad (p -valor del Test de Shapiro), homocedasticidad (p – valor del Test de Barlett) y comparación del p - valor con el test más adecuado para cada caso, en función del cumplimiento de la homocedasticidad y normalidad, y grupos homogéneos para cada concentración del tratamiento con propóleo.

Muestreo	Concentración propóleo (mg/ml)	Norm p-valor Test de Shapiro	Homkd p-valor (Test)	Comparación p-valor (Test)	Grupos homogéneos
1	5	0,037			a
	10	0,828	0,25910	0,0000206	a b
	20	0,415	(Bartlett)	(Anova)	b
	40	0,702			b
2	5	0,548			a
	10	0,754	0,15700	0,00016000	a
	20	0,545	(Bartlett)	(Anova)	b
	40	0,656			b
3	5	0,823			a
	10	0,397	0,73500	0,71300000	b
	20	0,430	(Bartlett)	(Anova)	a
	40	0,041			a c

4.2.4 Comparación de los tratamientos respecto a los controles por muestreo

El comportamiento de las diferentes concentraciones para todos los tratamientos se comparó con sus respectivos controles mediante el Test de Dunnett. Este Test indicó la existencia de diferencias significativas entre los datos de cada grupo y sus respectivos controles, por lo que las comparaciones no se realizaron entre concentraciones de un mismo tratamiento, sino entre cada concentración y sus controles correspondiente, por muestreo.

4.2.4.1 Tratamientos con nanoplata

En todas las concentraciones y muestreos de los tratamientos con nanopartículas de plata se observaron diferencias significativas con respecto a los controles, evidenciándose el carácter protector de este producto a bajas concentraciones y a lo largo del tiempo.

En la Tabla 12 se establecen los grupos homogéneos respecto al control para cada una de las concentraciones de cada tratamiento por muestreo.

Tabla 12. Comparación (p - valor con Anova) y grupos homogéneos respecto a los controles para cada concentración y muestreo del tratamiento con nanoplata. Los grupos homogéneos respecto al control (concentración 0) se expresan como: a: No existen diferencias significativas respecto a los controles. b: Existen diferencias significativas respecto a los controles.

Muestreo	Concentración propóleo (mg/ml)	Comparación p-valor (Test)	Grupos homogéneos
1	0	1,97 · 10 ⁻¹⁰ (Anova)	a
	5		b
	10		b
	20		b
	40		b
2	0	0,00000000349 (Anova)	a
	5		b
	10		b
	20		b
	40		b
3	0	3,42 · 10 ⁻¹⁵ (Anova)	a
	5		b
	10		b
	20		b
	40		b

4.2.4.2 Tratamientos con oligómeros de quitosano

La pérdida de masa de todas las concentraciones de oligómeros de quitosano en el primer y segundo muestreo fueron significativamente diferentes a la pérdida de masa de los controles, por lo que parece que fueron capaces de proteger a la madera del ataque de *T. versicolor*. Sin embargo, en el tercer muestreo, la pérdida de masa de las concentraciones de 20 y 40 mg/ml fue significativamente similar a la de los controles.

En la Tabla 13 se establecen los grupos homogéneos respecto al control para cada una de las concentraciones de cada tratamiento por muestreo.

Tabla 13. Comparación (p - valor con Anova) y grupos homogéneos respecto a los controles para cada concentración y muestreo del tratamiento con oligómeros de quitosano. Los grupos homogéneos respecto al control (concentración 0) se expresan como: a: No existen diferencias significativas respecto a los controles. b: Existen diferencias significativas respecto a los controles.

Muestreo	Concentración propóleo (mg/ml)	Comparación p-valor (Test)	Grupos homogéneos
1	0	0,0000012 (Anova)	a
	5		b
	10		b
	20		b
	40		b
2	0	0,0000474 (Anova)	a
	5		b
	10		b
	20		b
	40		b
3	0	0,000578 (Anova)	a
	5		b
	10		a
	20		a
	40		b

4.2.4.3 Tratamientos con propóleo

La mayoría de las concentraciones de propóleo, independientemente del muestreo, sufrieron una pérdida de masa significativamente similar a la de los controles, excepto la concentración más alta (40 mg/ml) durante el primer y el segundo muestreo.

En la Tabla 14 se establecen los grupos homogéneos respecto al control para cada una de las concentraciones de cada tratamiento por muestreo.

Tabla 14. Comparación (p - valor con Anova) y grupos homogéneos respecto a los controles para cada concentración y muestreo del tratamiento con propóleo. Los grupos homogéneos respecto al control (concentración 0) se expresan como: a: No existen diferencias significativas respecto a los controles. b: Existen diferencias significativas respecto a los controles.

Muestreo	Concentración propóleo (mg/ml)	Comparación p-valor (Test)	Grupos homogéneos
1	0	0,000436 (Anova)	a
	5		a
	10		a
	20		a
	40		b
2	0	0,00642 (Anova)	a
	5		a
	10		a
	20		a
	40		b

Tabla 14 (Cont.) Comparación (p - valor con Anova) y grupos homogéneos respecto a los controles para cada concentración y muestreo del tratamiento con propóleo. Los grupos homogéneos respecto al control (concentración 0) se expresan como: a: No existen diferencias significativas respecto a los controles. b: Existen diferencias significativas respecto a los controles.

Muestreo	Concentración propóleo (mg/ml)	Comparación p-valor (Test)	Grupos homogéneos
3	0	0,929 (Anova)	a
	5		a
	10		a
	20		a
	40		a

4.2.5 Comparación de los tratamientos con los controles con independencia del tiempo

En este apartado se compara cada concentración de cada tratamiento, sin tener en cuenta el factor muestreo, con sus controles correspondientes con el fin de determinar su eficacia.

Los datos de todos los muestreos se agruparon por concentración y tratamiento, y se ajustaron a un modelo general lineal. El estudio de la varianza de este modelo confirmó la existencia de diferencias significativas de cada concentración y tratamiento respecto a los controles cuando $\alpha < 0,05$.

4.2.5.1 Tratamientos con nanoplata

A diferencia de los dos tratamientos anteriores, la nanoplata presentó unos porcentajes de pérdida de masa (Tabla 15) significativamente diferentes, y en todos los casos muy inferiores, a la sufrida en los controles (Figura 26). Por lo que se pudo esperar un efecto protector de la madera contra el hongo de pudrición blanca a bajas concentraciones y largo plazo.

Tabla 15. Pérdida de masa media (%) de los tres muestreos y grupos homogéneos para las cuatro concentraciones de nanoplata y sus controles (concentración 0).

Tratamiento	Concentración	Pérdida de masa (%)	Grupos homogéneos
Nanoplata (ppm)	0	19,329 ($\pm 2,129$)	a
	5	9,229 ($\pm 0,067$)	b
	10	8,897 ($\pm 0,075$)	b
	15	9,534 ($\pm 0,244$)	b
	20	8,219 ($\pm 0,247$)	b

Respuesta del tratamiento con nanoplata

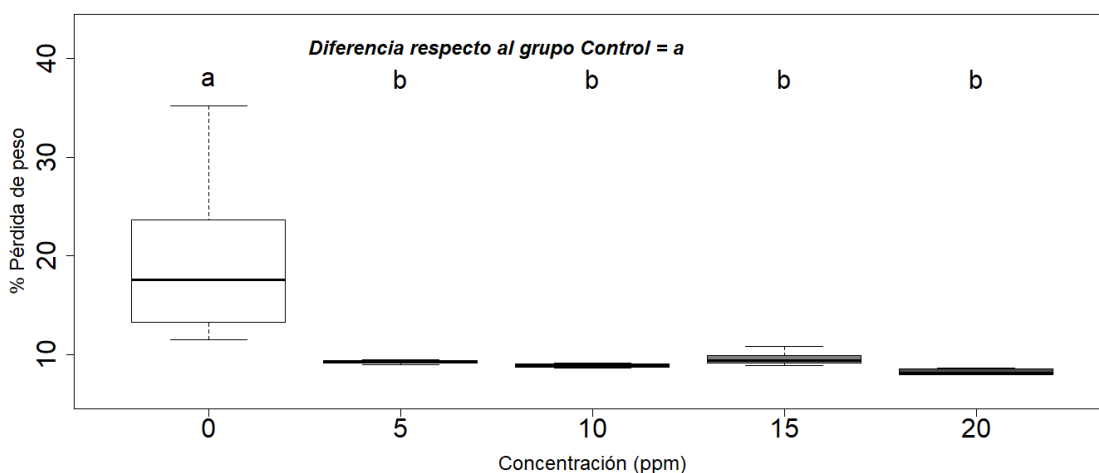


Figura 26. Respuesta del tratamiento con nanoplata, agrupando los datos de los tres muestreos, respecto a los controles. Los grupos homogéneos respecto al control (concentración 0) se expresan como: a: No existen diferencias significativas respecto a los controles. b: Existen diferencias significativas respecto a los controles.

4.2.5.2 Tratamientos con oligómeros de quitosano

En la Tabla 16 se recogen los porcentajes de pérdida de masa de la madera tratada con oligómeros de quitosano. Las bajas y medias concentraciones de oligómeros de quitosano (10, 20 y 40 mg/ml) no presentaron diferencias significativas respecto a la pérdida de masa de los controles, aunque el porcentaje de pérdida de masa para estas tres concentraciones fue menor que la de los controles. Solamente se observó el carácter protector de la concentración más alta (80 mg/ml), por presentar diferencias significativas en su variación de masa respecto a la de los controles (Figura 27).

Tabla 16. Pérdida de masa media (%) de los tres muestreos y grupos homogéneos para las cuatro concentraciones de oligómeros de quitosano y sus controles (concentración 0).

Tratamiento	Concentración	Pérdida de masa (%)	Grupos homogéneos
Oligómeros de quitosano (mg/ml)	0	22,274 (\pm 2,9780)	a
	10	14,982 (\pm 2,836)	a
	20	15,009 (\pm 3,663)	a
	40	15,219 (\pm 3,887)	a
	80	10,646 (\pm 3,666)	b

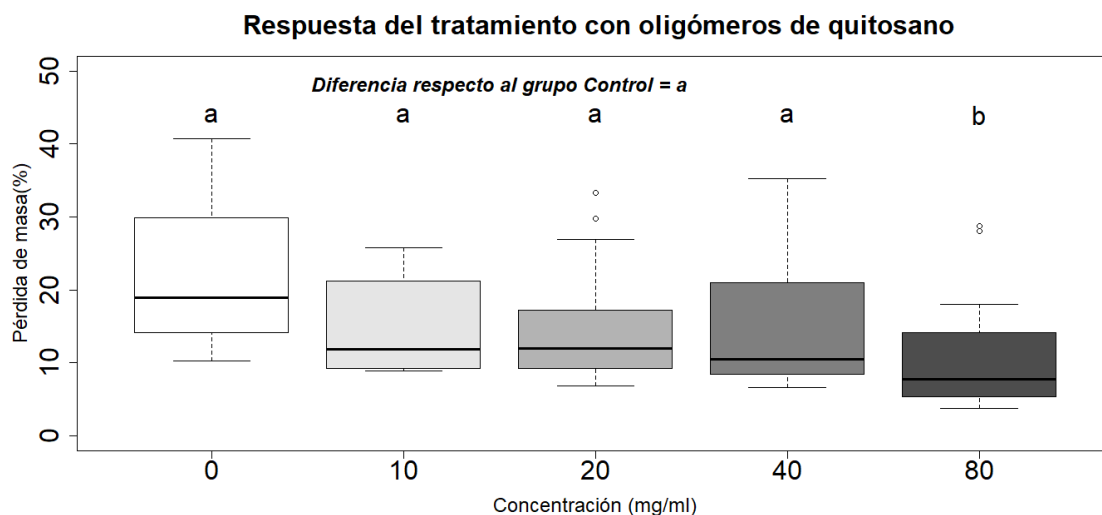


Figura 27. Respuesta del tratamiento con oligómeros de quitosano, agrupando los datos de los tres muestreos, respecto a los controles. Los grupos homogéneos respecto al control (concentración 0) se expresan como: a: No existen diferencias significativas respecto a los controles. b: Existen diferencias significativas respecto a los controles.

4.2.5.3 Tratamientos con propóleo

Las diferentes concentraciones del tratamiento de propóleo no parecieron ejercer ningún efecto protector, como se comentó en epígrafes anteriores, contra el hongo de pudrición blanca *T. versicolor*, ya que la pérdida de masa para todas las concentraciones no difirió significativamente de las pérdidas de masa de los controles (Figura 28). Obteniéndose la menor pérdida de masa para la concentración más alta (40 mg/ml) y la más alta para la segunda concentración más baja (10 mg/ml), superando ésta la pérdida de masa de los controles (Tabla 17).

Tabla 17. Pérdida de masa media (%) de los tres muestreos y grupos homogéneos para las cuatro concentraciones de propóleo y sus controles (concentración 0).

Tratamiento	Concentración	Pérdida de masa (%)	Grupos homogéneos
Propóleo (mg/ml)	0	16,493 (\pm 1,610)	a
	5	16,086 (\pm 1,946)	a
	10	17,316 (\pm 1,974)	a
	20	14,989 (\pm 1,971)	a
	40	13,198 (\pm 1,933)	a

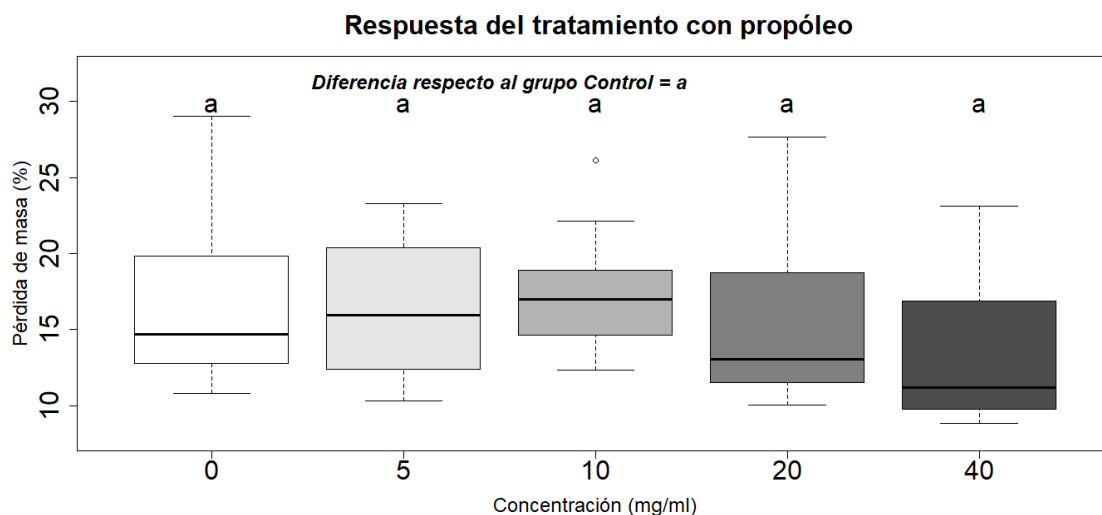


Figura 28. Respuesta del tratamiento con propóleo, agrupando los datos de los tres muestreos, respecto a los controles. Los grupos homogéneos respecto al control (concentración 0) se expresan como: a: No existen diferencias significativas respecto a los controles. b: Existen diferencias significativas respecto a los controles.

4.3 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

4.3.1 Degradación de la madera de *Populus* sp. por *Trametes versicolor*

La madera expuesta al ataque de *T. versicolor* sin recibir ningún tratamiento protector (controles) ha sufrido una degradación progresiva a lo largo de los muestreos realizados, pasando de valores de 13,5 – 14,5% a las 4 semanas, de 1, 16,0 – 19,4% a las 8 semanas y de 19,9 – 32,8% a las 12 semanas.

Según la norma EN:113 la degradación de las maderas blandas por el hongo de pudrición blanca *T. versicolor* debe ser superior al 15% a las 16 semanas de la inoculación, parámetro que se cumple desde la octava semana de tratamiento. Por lo que se confirma que *T. versicolor* degrada la madera de *Populus* sp.

En la Figura 29 pueden observarse la degradación de la pared celular de los vasos y elementos vasculares longitudinales de la madera no tratada y sometida a la acción de *T. versicolor* durante 12 semanas, mientras que en la figura de la derecha, perteneciente a una muestra de madera de chopo sana, no se observa dicha degradación.

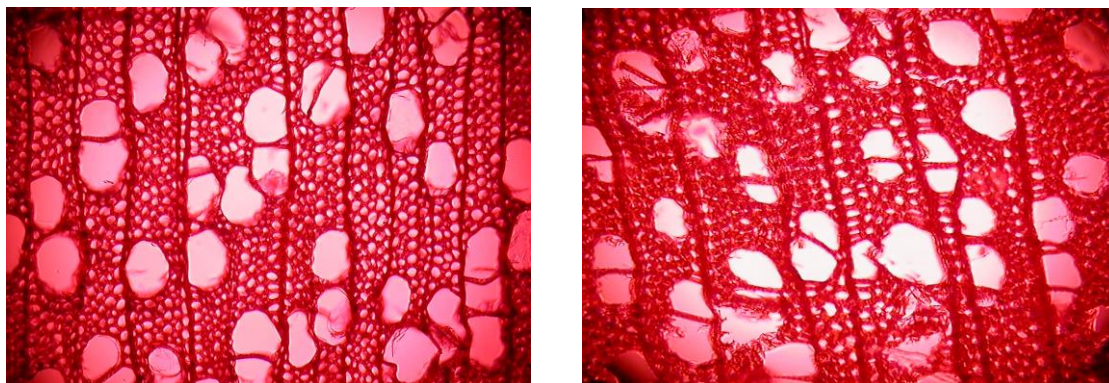


Figura 29. Corte transversal de la madera de una probeta de chopo sin tratamiento ni inoculación de hongo (izquierda) y corte de una probeta control sometida a la acción de *T. versicolor* durante 12 semanas. (x100).

4.3.2 Tratamientos con nanoplata

Los tratamientos a base de nanopartículas de plata presentan un comportamiento y unas propiedades protectoras de la madera diferentes a las de los productos tradicionales a base de iones de plata (Akhtari *et al.*, 2013). Una de las principales ventajas de los protectores con base de nanoplata es el aumento del área superficial efectiva, formada por partículas de plata de tamaño nanométrico (Clausen *et al.*, 2009) que sirven de reservorio de iones de plata de lenta liberación, asegurando la protección de la madera durante largos periodos de tiempo (Matsunaga *et al.*, 2009). Este efecto protector a largo plazo se ha observado durante el desarrollo del ensayo, ya que la pérdida de masa para todas las concentraciones de los tratamientos con nanoplata ha oscilado entre el 8 y el 10% en los tres muestreos, siendo significativamente similares entre sí. Sin embargo, en los controles se ha observado un aumento progresivo de la pérdida de masa a lo largo de los tres muestreos, de 13,7%, 17,5 y 26,6%, respectivamente, siendo estos significativamente diferentes de todas las concentraciones de los tratamientos (Figura 30).



Figura 30. Probetas tratadas con una concentración de nanoplata de 5 ppm y probeta control no tratada en medio a las 12 semanas de la inoculación del hongo (izquierda); Probetas tratadas con una concentración de nanoplata de 20 ppm (arriba) y probetas control no tratadas tras 12 semanas de la inoculación del hongo (derecha).

En los tres muestreos, los tratamientos con mayor concentración (20 ppm) presentan una pérdida de masa significativamente diferente a la del resto de concentraciones. Por otro lado, tras 12 semanas de exposición al hongo, se ha observado que la concentración de 15 ppm también es significativamente diferente del resto. Estas tendencias, evidencian un carácter poco marcado, pero creciente en las concentraciones más altas, del aumento de la efectividad del carácter protector de la nanoplata con el aumento de la concentración. Esta tendencia ha sido previamente observada por Taghiyari *et al.* (2014) en un estudio realizado sobre tableros de partículas impregnados con diferentes concentraciones de protectores a base de nanopartículas de plata y cobre contra el hongo de pudrición blanca *T. versicolor*, y por Nair *et al.* (2017) en protectores a base de nanopartículas de zinc impregnadas en madera de *Hevea brasiliensis* Müll.Arg mediante autoclave. Independientemente del hecho de que las concentraciones más altas parecen ofrecer una mejor protección, en todos los muestreos, todas las concentraciones presentan una pérdida de masa similar y significativamente diferente de la de los controles, evidenciando el carácter protector de la concentración más baja de 5 ppm. Sin embargo, para ninguna de las concentraciones se consigue una pérdida de masa inferior a la definida por la norma EN:113, del 3%, para validar la nanoplata como protector de la madera de *Populus* sp. contra *T. versicolor*. Dorau *et al.* (2003) define que la concentración mínima de iones de plata con acción antifúngica *in vitro* para diferentes hongos xilófagos es de 0,0019 ppm. Kartal *et al.* (2009) testaron la eficacia de nanopartículas de plata, cobre, cinc y boro al 1% (v/v) contra el hongo de pudrición blanca *T. versicolor*, registrando valores de pérdida de masa en madera de *Pinus echinata* Mill. menores al 10% en el caso de la nanoplata, el nanocobre y el nanoboro, y del 20% en el caso del nanocinc, frente al 30% de la pérdida de masa observada en los controles tras 6 semanas de exposición al hongo. Esta concentración tampoco cumple con los criterios definidos por la norma EN:113. Sin embargo, Akhtari & Arefkhani (2013) comprobaron la eficacia de soluciones acuosas de nanoplata con una concentración de 400 ppm, contra el hongo de pudrición blanca *T. versicolor* en madera de *Paulownia fortunei* L., siguiendo la metodología descrita por la norma EN:113. Según este estudio, el porcentaje de pérdida de masa de la madera tratada fue de 2,1% a las 4 semanas tras la inoculación del hongo, mientras que la pérdida de masa de los controles fue del 28,13%, porcentaje similar al observado en el presente estudio tras 12 semanas de exposición al hongo (26,6%). Teniendo en cuenta que la concentración propuesta por Akhtari & Arefkhani (2013) es veinte veces superior a la concentración más alta testada en este estudio (20 ppm), es evidente que se consiga una mayor protección de la madera, confirmando la teoría de que el carácter protector de la nanoplata aumenta con su concentración. Teniendo en cuenta el criterio de validación de la norma EN:113 sobre productos protectores de la madera, se debería testar la eficacia de concentraciones más altas hasta lograr una pérdida de masa inferior al 3%, como en el caso de Akhtari & Arefkhani (2013) con madera de *P. fortunei*.

La eficacia antifúngica de las nanopartículas metálicas está influenciada por el medio en el que se dispersan, su tamaño en la dispersión y la estabilidad de dicha dispersión

(Nair *et al.*, 2017). Las nanopartículas en forma concentrada están sujetas a fuerzas de Van der Waals, tendiendo a la precipitación. La adición de un tensioactivo a la solución aumenta su estabilidad, evitando la precipitación de las nanopartículas y favoreciendo su dispersión en la madera cuando presenta un alto contenido en nanometales (Clausen *et al.*, 2009). Los polímeros, como el quitosano, se utilizan como estabilizadores de nanopartículas para prevenir su aglomeración y precipitación (Bin *et al.*, 2011), además, presentan un doble mecanismo de acción antifúngica debido al efecto protector del nanometal y del quitosano (Wei *et al.*, 2009). El uso de oligómeros de quitosano como medio dispersante de las diferentes concentraciones de nanoplatas testadas en este trabajo, parece haber sido efectivo en las concentraciones más bajas, suponiendo una dispersión homogénea de las nanopartículas en el interior de la madera debido al aspecto externo de las probetas y al carácter protector observado a lo largo de los muestreos. Sin embargo, en la concentración más alta de 20 ppm las probetas presentan un aspecto exterior metalizado (Figura 31 derecha) que evidencia la presencia de precipitados de plata, por lo que en este caso, el carácter dispersante de los oligómeros de quitosano parece no haber funcionado de forma tan efectiva como en el resto de concentraciones, dando lugar a precipitados exteriores que no tienen por qué indicar una falta de penetración de la solución (Figura 32). Por otro lado, el carácter protector superior que presenta esta concentración respecto al resto podría deberse a una doble acción protectora, interior, por la penetración de la dispersión de nanopartículas, y exterior debida al recubrimiento ofrecido por los precipitados de nanopartículas.



Figura 31. De izquierda a derecha, arriba y abajo: Probetas tratadas con 5, 10, 15 y 20 ppm de nanoplatas tras el periodo de estabilización en condiciones de laboratorio durante una semana.

El tamaño de las nanopartículas de plata es otra de las características que define su carácter antifúngico, ya que para conseguir una penetración completa y uniforme dentro de las paredes celulares de la madera, se requieren nanopartículas de plata

con un tamaño entre 2 y 4 nm (Matsunaga *et al.*, 2009). En este estudio, según las mediciones realizadas en el espectrofotómetro, se han sintetizado soluciones de nanoplata con un tamaño de 20 nm. El tamaño de las punteaduras de las paredes celulares del género *Populus* es de 5 μm (García *et al.*, 2003), por lo que no se ha conseguido una penetración a nivel celular, pero sí a nivel vascular (Figura 32). Los cortes realizados sobre diferentes probetas tratados con nanoplata muestran una distribución irregular de partículas o agregados de nanopartículas de plata dentro de los vasos, al igual que observó Matsunaga *et al.* (2009) en madera tratada con nanopartículas de cobre.

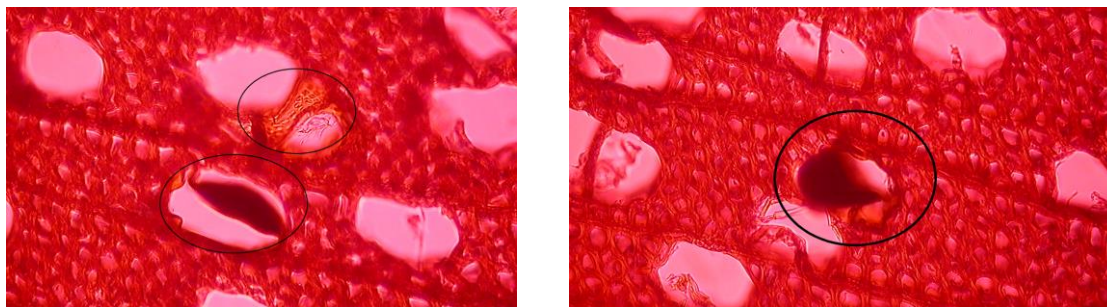


Figura 32. Agregados de nanopartículas de plata dentro de dos vasos (oscuro) y restos de quitosano (amarillo) de una de las probetas tratadas con 20 ppm de nanoplata tras 12 semanas desde la inoculación con *T. versicolor*. (x200).

Para conseguir una protección antifúngica de la madera de *Populus* sp. con productos con base de nanoplata, cumpliendo los requerimientos exigidos por la norma EN:113, es necesario testar concentraciones superiores a las definidas en este trabajo. Además, es recomendable sintetizar nanopartículas de plata con un tamaño de inferior al conseguido en este ensayo y a la luz de las punteaduras de las paredes celulares de la madera de chopo, para conseguir una protección a nivel celular. Para la preparación de estas nuevas concentraciones se pueden considerar métodos de síntesis alternativos, mediante la disolución de la sal en otros solventes, o mediante la aplicación de otros métodos, como los basados en la sonicación de la plata.

4.3.3 Tratamientos con oligómeros de quitosano

La capacidad de inhibición fúngica del quitosano contra *T. versicolor* ha sido demostrada *in vitro* en agar por Frederiksen (2001) y Eikenes *et al.* (2005). Según estos autores, concentraciones de quitosano disuelto en ácido acético 0,1M de 0,5 mg/ml inhiben el crecimiento *in vitro* de *T. versicolor* en un 90%, mientras que concentraciones de 1 mg/ml inhiben totalmente su crecimiento. Este carácter antifúngico en el presente estudio solamente se ha observado durante el muestreo 1, tras 4 semanas de exposición al hongo, ya que tras 8 y 12 semanas de exposición, la pérdida de masa de todas las concentraciones de los tratamientos de oligómeros de quitosano es significativamente similar a la pérdida de masa observada en los controles.

El carácter protector observado durante el muestreo 1 no supera los límites establecidos por la norma EN:113, ya que en todas las concentraciones la pérdida de masa es superior al 3%. Evidentemente, tampoco se cumple para las concentraciones de los muestreos 2 y 3, en los que se observa un aumento de la pérdida de masa aumenta con el paso del tiempo. Frederiksen (2001) testó el carácter protector de dos concentraciones de 10 g/l de quitosanos de bajo y alto peso molecular sobre madera de haya según la norma EN:113. La pérdida de masa de ambos tratamientos, a las 16 semanas de exposición al hongo, es de 21 y 23% para los tratamientos de bajo y alto peso molecular respectivamente, y de 25 y 28% para sus correspondientes controles, no cumpliendo los requerimientos definidos por la norma EN:113. Comparando los resultados de este estudio con los obtenidos tras 12 semanas de exposición al hongo, pueden considerarse similares (18,0 – 27,0%), teniendo en cuenta que la concentración mayor (80 mg/ml) es 125 veces menor que la aplicada por Frederiksen (2001). Por otro lado, estos resultados indican que mayores concentraciones de quitosano no ofrecen un mayor carácter protector, por lo menos con el paso del tiempo.

Por otro lado, parece observarse un carácter antifúngico de los oligómeros de quitosano que desaparece con el paso del tiempo. En el muestreo 1, tras 4 semanas de exposición de la madera a la acción de *T. versicolor*, se observa una tendencia protectora que aumenta con la concentración de quitosano. Sin embargo, esta tendencia deja de observarse durante los muestreos realizados a las 8 y 12 semanas de exposición, cuando la pérdida de masa de todas las concentraciones es significativamente similar. Alfredsen *et al.* (2004) observaron que el rendimiento protector del quitosano a largo plazo no es suficiente en comparación con el de otros fungicidas comerciales, confirmando la teoría de susceptibilidad de los compuestos orgánicos a la biodegradación propuesta por Singh & Singh (2010). Según Frederiksen (2001) esta pérdida de efectividad del quitosano con el paso del tiempo puede deberse a su inhibición por degradación fúngica, es decir, por la acción de las enzimas excretadas por los hongos para la degradación de la celulosa, cuya estructura es similar a la del quitosano. Según esta teoría, la acción de *T. versicolor* no tendría por qué afectar a la efectividad protectora del quitosano, ya que se alimenta de la lignina y hemicelulosa, aunque en menor medida también es capaz de degradar la celulosa (Rodríguez, 1998; Peraza, 2001).

La capacidad de penetración de las soluciones de quitosano depende de su concentración y peso molecular. A mayor concentración mayor viscosidad y menor capacidad de penetración, mientras que mayor peso molecular mayor capacidad de retención por el aumento de la relación electroestática que se crea con la celulosa (Eikenes *et al.*, 2005). Alfredsen *et al.* (2004) impregnó probetas de *Pinus sylvestris* L. con concentraciones al 5% de quitosano de alto, medio y bajo peso molecular, observando que la pérdida de peso de la madera es menor en las soluciones de medio y alto peso molecular. Por lo tanto, con el uso de quitosano de medio peso molecular cabe esperar una buena respuesta antifúngica y una alta capacidad de retención,

como se puede observar en la Figura 33, donde se aprecian grupos de oligómeros de quitosano.

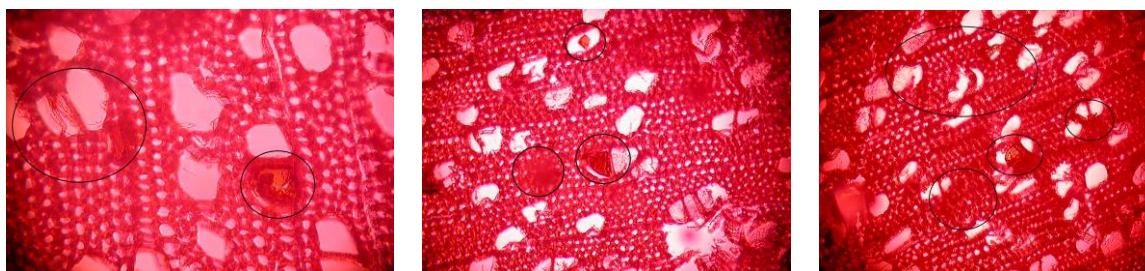


Figura 33. Cortes transversales con grupos de oligómeros de quitosano dentro de dos vasos y zonas teñidas ligeramente de amarillo debido a la impregnación de las paredes celulares con oligómeros de quitosano para una probeta impregnada con una concentración de 80 mg/ml tras 12 semanas de exposición a *T. versicolor*. (x200,x100,x100).

La comparación realizada de las concentraciones para todos los tratamientos, con independencia del muestreo, con sus respectivos controles, muestran que en todas las concentraciones, excepto en la mayor de 80 mg/ml, la pérdida de masa es significativamente igual a la de los controles. La mayor capacidad protectora de la solución de 80 mg/ml puede deberse a la creación de una película exterior debido a su mayor viscosidad y capacidad de retención (Alfredsen *et al.*, 2004) respecto al resto de concentraciones. Este recubrimiento podría asociarse con las tonalidades más oscuras observadas en las probetas tratadas con la concentración superior respecto al resto (Figura 34).

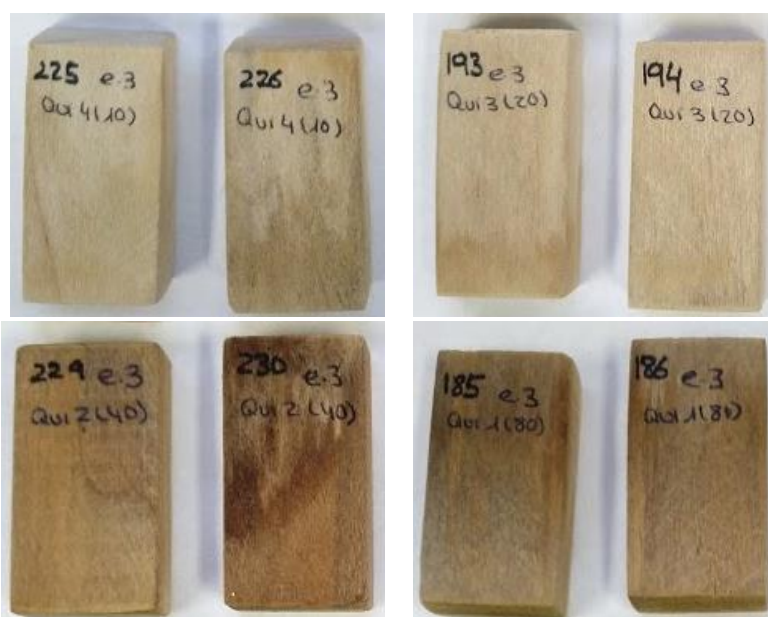


Figura 34. De izquierda a derecha, arriba y abajo: Probetas tratadas con 10, 20, 40 y 80 mg/ml de oligómeros de quitosano tras el periodo de estabilización en condiciones de laboratorio durante 1 semana.

Los resultados obtenidos parecen evidenciar la degradación de la acción antifúngica del quitosano con el paso del tiempo, por lo que su uso parece limitarse a solvente de

otros elementos protectores de la madera que no se degraden con el paso del tiempo, como las nanopartículas metálicas.

4.3.4 Tratamientos con propóleo

Los tratamientos con propóleo no han protegido a la madera de *Populus* sp. contra el ataque del hongo de pudrición blanca *T. versicolor*. La pérdida de masa de para todas las concentraciones, independientemente del tiempo de exposición al hongo, es significativamente similar a la de los controles. Comparando los diferentes tratamientos por muestreo parece observarse un aumento del carácter protector del propóleo con el aumento de la concentración tras 4 y 8 semanas a la exposición del hongo, sin embargo, esta tendencia desaparece tras 12 semanas de exposición, cuando la pérdida de masa de la concentración 5 mg/ml es significativamente similar a la de la concentración de 15 mg/ml, pero significativamente diferente de las concentraciones de 10 y 20 mg/ml. La comparación de las distintas concentraciones por muestreo respecto a sus controles muestra que la pérdida de masa para el tratamiento de mayor concentración (40 mg/ml) tras 4 y 8 semanas de exposición al hongo, es significativamente diferente a la de sus controles, desapareciendo este comportamiento a las 12 semanas de exposición.

Independientemente de las concentraciones y tiempos de exposición de la madera al ataque de *T. versicolor*, en ningún caso se cumple la normativa EN:113, ya que la pérdida de masa es superior al 3%. Wózniak *et al.* (2015b) en su estudio sobre acción antifúngica de una solución de propóleo al 30% sobre *P. sylvestris* inoculado con el hongo de pudrición parda *Coniophora puteana* (Schumach.) P. Karst., en base a la norma EN:113, observa una pérdida de masa en las muestras tratadas del 3,7%, frente al 50% de la de las muestras control. Este resultado puede deberse al tipo de hongo utilizado en el ensayo, ya que los hongos de pudrición parda se alimentan de la celulosa de la madera, mientras que los hongos de pudrición blanca, como es *T. versicolor*, se alimentan de la lignina.

La falta de efectividad antifúngica de los tratamientos con propóleo puede deberse a la pérdida de su efectividad con el paso del tiempo o a la falta de retención de la solución, muy común en los biocidas orgánicos (Singh & Singh (2010)). En la Figura 35 se presenta un corte transversal de una de las probetas tratadas con una concentración de propóleo de 40 mg/ml tras 12 semanas de exposición al hongo, en esta no se aprecia ningún precipitado de propóleo dentro de los vasos conductores, como se observa en el caso de los tratamientos con nanoplata (Figura 32) y oligómeros de quitosano (Figura 33).

La evidente pérdida biodegradación sufrida por el propóleo a corto plazo parece un factor limitante de gran importancia para su utilización como protector de la madera.

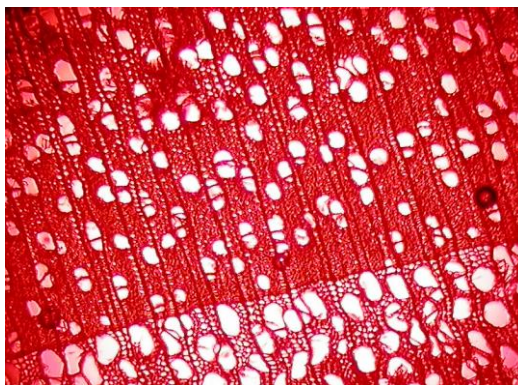


Figura 35. Corte transversal de una probeta tratada con una concentración de 40 mg/ml tras 12 semanas de exposición al hongo en la que no se observan restos de propóleo, pero sí una degradación de la pared celular en los vasos y en elementos vasculares. (x100).

5 CONCLUSIONES

- Los tratamientos a base de nanoplata presentan un efecto antifúngico a largo plazo contra la degradación del hongo de pudrición blanca *T. versicolor* en madera de *Populus* sp., tratada mediante autoclave, no siendo así para los tratamientos de oligómeros de quitosano y propóleo, los cuales parecen perder su efectividad antifúngica a corto plazo.
- El método de síntesis utilizado para la preparación de los tratamientos con nanoplata mediante una solución de quitosano de medio peso molecular como agente reductor y estabilizador de la nanoplata, podría ser más efectivo si se alcanzara un tamaño de nanopartículas lo suficientemente pequeño como para permitir su penetración en las paredes celulares de la madera. Por otro lado, puede ser que el quitosano no haya servido como agente estabilizador para la concentración más alta, ya que se han observado precipitados de plata en la superficie de las probetas tratadas.
- Se debe seguir trabajando en el método de síntesis de las soluciones de oligómeros de quitosano no ha sido efectivo, ya que se biodegrada a corto plazo.
- Se debe mejorar el método de síntesis de las soluciones propóleo no ha sido el adecuado, ya el efecto protector se pierde con el paso del tiempo.
- El hongo de pudrición blanca *T. versicolor* degrada la madera de chopo, como era de esperar. Esta degradación se por evidencia el aumento de la pérdida de masa de los controles a lo largo del tiempo.
- Las concentraciones impregnadas mediante autoclave sobre madera de *Populus* sp. que presentan un carácter protector frente a la acción de *T. versicolor* resultaron se las de mayor concentración del tratamiento con oligómeros de quitosano (80 mg/ml) y todas las concentraciones del tratamiento de nanoplata (5, 10, 15 y 20 ppm).

- Las concentraciones definidas para todos los tratamientos en autoclave para la protección de la madera de *Populus* sp. contra *T. versicolor* no se consideran válidas según el criterio establecido por la norma EN:113, ya que en ninguno de los casos la pérdida de masa por la acción del hongo ha sido menor al 3%. Por ello, se debe seguir investigando con concentraciones más altas y resolviendo los problemas comentados sobre la síntesis de dichos compuestos.

6 **BIBLIOGRAFÍA**

- AENOR. (2008). UNE-EN 351-1:2008: Durabilidad de la madera y de los productos derivados de la madera. Madera maciza tratada con productos protectores. Parte 1: Clasificación de las penetraciones y retenciones de los productos protectores. Comité Europeo para la estandarización. Bruselas.
- AENOR. (1996). UNE-EN 113:1996. Protectores de la madera. Métodos de ensayo para la determinación de la eficacia preventiva contra los basidiomicetos destructores de la madera. Determinación de los valores tóxicos. Comité Europeo para la estandarización. Bruselas.
- AKHTARI, M., & AREFKHANI, M. (2013). Study of microscopy properties of wood impregnated with nanoparticles during exposed to white-rot fungus. Agriculture Science Developments, vol. 2(11), pp. 116-119.
- AKHTARI, M., GHORBANI-KOKANDEH, M., & TAGHIYARI, H. R. (2012). Mechanical properties of *Paulownia fortunei* wood Impregnated with silver, copper and zinc oxide Nanoparticles. Journal of Tropical Forest Science, vol. 24(4), pp. 507-511.
- AKHTARI, M., TAGHIYARI, H. R., & KOKANDEH, M. G. (2013). Effect of some metal nanoparticles on the spectroscopy analysis of *Paulownia wood* exposed to white-rot fungus. European Journal of Wood and Wood Products, vol. 71(2), pp. 283-285.
- ALFREDSSEN, G., EIKENES, M., MILITZ, H., & SOLHEIM, H. (2004). Screening of chitosan against wood-deteriorating fungi. Scandinavian Journal of Forest Research, vol. 19(5), pp. 4-13.
- ARRIAGA, F., GONZÁLEZ, M.A., MEDINA, G., ORTIZ, J., PERAZA, F., PERAZA, J.E. & TOUZA, M. (1994). **Guía de la madera. Un manual de referencia para el uso de la madera en arquitectura, construcción, y el diseño y la decoración.** Madrid. AITIM.
- BADAWY, M. E., & 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, 29 pages.
- BIN AHMAD, M., LIM, J. J., SHAMELI, K., IBRAHIM, N. A., & TAY, M. Y. (2011). Synthesis of silver nanoparticles in chitosan, gelatin and chitosan/gelatin bionanocomposites by a chemical reducing agent and their characterization. Molecules, vol. 16(9), pp. 7237-7248.
- BIOLOGÍA VEGETAL. (2012). Tema 1. La célula vegetal. estructura celular e intercomunicaciones [Online]. Disponible en: <http://biovegetal.es/docencia-asignaturas-impartidas/biolog%C3%ADa-de-la-plantas/tema-1/> [Consultado a: 23/06/2018]

- BURDOCK, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical toxicology*, vol. 36(4), pp. 347-363.
- CASADO, M., ACUÑA, L., VECILLA, D., BASTERRA, L. A., RELEA, E., & LÓPEZ, G. (2011). Ultrasonidos y parámetros de clasificación visual para la caracterización de madera estructural de *Populus x euramericana* I-214. CIMAD 11 – 1º Congreso Ibero – Latino Americano da Madeira na Construcao. Coimbra (Portugal), 7 – 9 de junio.
- CLAUSEN, C. A. (2007). Nanotechnology: implications for the wood preservation industry. IRG/WP; 07-30415. Stockholm, Sweden: IRG Secretariat, 2007: 10 pages.
- CLAUSEN, C. A., YANG, V. W., ARANGO, R. A., & GREEN III, F. (2009). Feasibility of nanozinc oxide as a wood preservative. *Proceedings of American Wood Protection Association*, vol. 105, pp. 255-260.
- DORAU, B., ARANGO, R., & GREEN III, F. (2004). An investigation into the potential of ionic silver as a wood preservative. In *Proceedings of the 2nd wood-frame housing durability and disaster issues conference*, pp. 133-145.
- EIKENES, M., ALFREDSSEN, G., CHRISTENSEN, B. E., MILITZ, H., & SOLHEIM, H. (2005). Comparison of chitosans with different molecular weights as possible wood preservatives. *Journal of Wood Science*, vol. 51(4), pp. 387-394.
- FREDERIKSEN, O. (2001). Fungicid fra rejer. Nordic Wood Project. Projekt nr. P99088. Nordisk Industrifond.
- FPL. (2011). Biología básica de la madera—Anatomía para la identificación [Online]. Disponible en: https://www.fpl.fs.fed.us/documnts/pdf2011/fpl_2011_wiedenhoeft002.pdf [Consultado a: 23/06/2018]
- GARCÍA, E., GUINDEO, A., PERAZA, C. & PALACIOS DE, P. (2003). **La madera y su anatomía. Anomalías y defectos, estructura microscópica de coníferas y frondosa, identificación de maderas, descripción de especies y pared celular.** Madrid. AITIM. Ediciones Mundi-Prensa.
- GOY, R. C., BRITTO, D. D., & ASSIS, O. B. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*, vol. 19(3), pp. 241-247.
- KARTAL, S. N., GREEN III, F., & CLAUSEN, C. A. (2009). Do the unique properties of nanometals affect leachability or efficacy against fungi and termites?. *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 63(4), pp. 490-495.
- MARCUCCI, M. C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, vol. 26(2), pp. 83-99.
- MARZBANI, P., & MOHAMMADNIA-AFROUZI, Y. (2014). Investigation on leaching and decay resistance of wood treated with nano-titanium dioxide. *Advances in Environmental Biology*, pp. 974-979.

- MATSUNAGA, H., KIGUCHI, M., & EVANS, P. D. (2009). Microdistribution of copper-carbonate and iron oxide nanoparticles in treated wood. *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 11(5), pp. 1087-1098.
- MOHAMMADZADEH, S., SHARRIATPANAHI, M., HAMED, M., AMANZADEH, Y., EBRAHIMI, S. E. S., & OSTAD, S. N. (2007). Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food chemistry*, vol. 103(3), pp. 729-733.
- MUKHERJEE, S., & PARIJA, S. (2013). Preparation and stability of nanofluids-a review. *IOSR Journal of Mechanical and civil engineering*, vol. 9(2), pp. 63-69.
- NATIONAL GEOGRAPHIC. (2013). Descubren el ataúd intacto de un niño [Online]. Disponible en: http://www.nationalgeographic.com.es/historia/actualidad/descubren-el-ataud-intacto-de-un-nino_6999/2 [Consultado a: 22/06/2018]
- NATIONAL GEOGRAPHIC. (2018a). Los altos sacerdotes del dios Thot fueron enterrados en este cementerio egipcio [Online]. Disponible en: http://www.nationalgeographic.com.es/historia/actualidad/los-altos-sacerdotes-del-dios-thot-fueron-enterrados-este-cementerio-egipcio_12428 [Consultado a: 22/06/2018].
- NATIONAL GEOGRAPHIC. (2018b). Los neandertales de la actual Toscana usaban el fuego para elaborar herramientas de madera [Online]. Disponible en: http://www.nationalgeographic.com.es/historia/actualidad/los-neandertales-actual-toscana-usaban-fuego-para-elaborar-herramientas-madera_12365/1 [Consultado a: 22/06/2018].
- NAIR, S., PANDEY, K. K., GIRIDHAR, B. N., & VIJAYALAKSHMI, G. (2017). Decay resistance of rubberwood (*Hevea brasiliensis*) impregnated with ZnO and CuO nanoparticles dispersed in propylene glycol. *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 122, pp. 100-106.
- QUIROGA, E. N., SAMPIETRO, D. A., SOBERÓN, J. R., SGARIGLIA, M. A., & VATTUONE, M. A. (2006). Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. *Journal of applied Microbiology*, vol. 101(1), pp. 103-110.
- PERAZA, F. (2001). **Protección preventiva de la madera**. Madrid. AITIM.
- PERAZA, F., ARRIAGA, F., GUINDEO, A., GARCÍA, L., KANSER, C., MEDINA, G., de PALACIOS, P. & TOUZA, M. (2004). **Especies de madera para la carpintería, construcción y mobiliario**. Madrid. AITIM.
- POPULUSCYL. (2017). La populicultura en Castilla y León [Online]. Disponible en: <http://www.populuscyl.es/contenido/la-populicultura-en-castilla-leon> [Consultado a: 23/06/2018]
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. (2018). A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

- RODRIGUEZ, J.A. (1998). **Patología de la madera**. Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. Coedición Fundación Conde del Valle de Salazar. Ediciones Mundi-Prensa.
- RABEA, E. I., BADAWY, M. E. T., STEVENS, C. V., SMAGGHE, G., & STEURBAUT, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, vol. 4(6), pp. 1457-1465.
- RASSAM, G., GHOFrani, M., TAGHIYARI, H. R., JAMNANI, B., & KHAJEH, M. A. (2012). Mechanical performance and dimensional stability of nano-silver impregnated densified spruce wood. *European Journal of Wood and Wood Products*, vol. 70(5), pp. 595-600.
- RATAJCZAK, I., WOŹNIAK, M., KWAŚNIEWSKA-SIP, P., SZENTNER, K., COFTA, G., & MAZELA, B. (2018). Chemical characterization of wood treated with a formulation based on propolis, caffeine and organosilanes. *European Journal of Wood and Wood Products*, vol. 76(2), pp. 775-781.
- ROY, N., MONDAL, S., LASKAR, R. A., BASU, S., MANDAL, D., & BEGUM, N. A. (2010). Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles by Indian propolis and its constituents. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 76(1), pp. 317-325.
- SHIH, C. M., SHIEH, Y. T., & TWU, Y. K. (2009). Preparation of gold nanopowders and nanoparticles using chitosan suspensions. *Carbohydrate Polymers*, vol. 78(2), pp. 309-315.
- SHIRAKAWA, M. A., GAYLARDE, C. C., SAHÃO, H. D., & LIMA, J. R. B. (2013). Inhibition of *Cladosporium* growth on gypsum panels treated with nanosilver particles. *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 85, 57-61.
- SILVA-CASTRO, I.; CASADO-SANZ, M., ACUÑA-RELLO, L., ALONSO-CORTÉS, A., MARTÍN-RAMOS, P. & MARTÍN-GIL, J. (2018). Chitosan and oligo-chitosan based composites to prevent the decay of *Populus* spp. wood caused by *Trametes versicolor*. Manuscrito no publicado.
- SINGH, T., VESENTINI, D., SINGH, A. P., & DANIEL, G. (2008). Effect of chitosan on physiological, morphological, and ultrastructural characteristics of wood-degrading fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 62(2), pp. 116-124.
- SINGH, T., & SINGH, A. P. (2012). A review on natural products as wood protectant. *Wood Science and Technology*, vol. 46(5), pp. 851-870.
- SOLER, M. (2001). **Mil maderas**. Valencia. Editorial UPV.
- SUN, T., ZHOU, D., XIE, J., & MAO, F. (2007). Preparation of chitosan oligomers and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, vol. 225(3-4), pp. 451-456.

- TAGHIYARI, H. R., MORADI-MALEK, B., KOOKANDEH, M. G., & BIBALAN, O. F. (2014). Effects of silver and copper nanoparticles in particleboard to control *Trametes versicolor* fungus. *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 94, pp. 69-72.
- TERZI, E., KARTAL, S. N., YILGÖR, N., RAUTKARI, L., & YOSHIMURA, T. (2016). Role of various nano-particles in prevention of fungal decay, mold growth and termite attack in wood, and their effect on weathering properties and water repellency. *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 107, pp. 77-87.
- TOUZA M. (2012). La madera modificada. Materiales de altas prestaciones para elaborar fachadas y pavimentos de exterior [Online]. Disponible en: http://www.proholz.es/fileadmin/proholz.es/media/download/manuel_touza-madera_modificada.pdf [Consultado a: 22/06/2018].
- VENKATESHAM, M., AYODHYA, D., MADHUSUDHAN, A., BABU, N. V., & VEERABHADRAM, G. (2014). A novel green one-step synthesis of silver nanoparticles using chitosan: catalytic activity and antimicrobial studies. *Applied Nanoscience*, vol. 4(1), pp. 113-119.
- PEÑA, S. V., & ROJAS, I. M. (2006). **Tecnología de la madera**. Madrid. Mundi-Prensa.
- WALKER, P., & CRANE, E. (1987). Constituents of propolis. *Apidologie*, vol. 18(4), pp. 327-334.
- WEI, D., SUN, W., QIAN, W., YE, Y., & MA, X. (2009). The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohydrate research*, vol. 344(17), pp. 2375-2382.
- WOISKY, R. G., & SALATINO, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of apicultural research*, vol. 37(2), pp. 99-105.
- WÓZNIAK, M., RATAJCZAK, I., RISSMANN, I., & MAZELA, B. (2015a). Propolis and organosilanes in wood protection. Part II: AAS and EA analyses. *Annals of Warsaw University of Life Sciences-SGGW. Forestry and Wood Technology*, vol. 91.
- WÓZNIAK, M., RATAJCZAK, I., SZENTNER, K., KWASNIEWSKA, P., & MAZELA, B. (2015b). Propolis and organosilanes in wood protection. Part I: FTIR analysis and biological tests. *Annals of Warsaw University of Life Sciences-SGGW. Forestry and Wood Technology*, vol. 91.
- WÓZNIAK, M., RATAJCZAK, I., KWAŚNIEWSKA, P., COFTA, G., HOŁDERNA-KĘDZIA, E., KĘDZIA, B., & MAZELA, B. (2015c). The activity of propolis extracts against selected moulds. *Postępy Fitoterapii*, vol., pp. 205-209
- XIA, W., LIU, P., ZHANG, J., & CHEN, J. (2011). Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, vol. 25(2), pp. 170-179.

7 AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mis tutores, Milagros Casado y Luis Acuña, la posibilidad de haber realizado el presente trabajo, así como sus consejos tanto a la hora del desarrollo del ensayo, tratamiento de datos y redacción del documento. Por otro lado, es de agradecer la libertad que me han facilitado a la hora de la toma de decisiones durante el desarrollo del trabajo.

Parte del ensayo no se podría haber realizado sin las instalaciones y materiales facilitados por Agustín León Alonso-Cortés.

Durante el desarrollo del trabajo he recibido la ayuda de diferentes personas a las que me gustaría agradecer su apoyo:

A losoddy Silva Castro por su ayuda durante todo el desarrollo del ensayo, desde la síntesis de los tratamientos hasta los consejos para la redacción del documento. El trabajo hubiera sido mucho más complejo sin su ayuda y experiencia.

A Alberto Sacristán por su participación durante las tardes de trabajo limpiando el hongo y pesando las probetas. Pero sobre todo por su paciencia y apoyo.

A mi compañera de máster Marina Mármol con el pesaje de las probetas al principio del ensayo y por su interés por el desarrollo del ensayo.

Finalmente me gustaría agradecer a mis padres su apoyo e interés durante el desarrollo del trabajo.