

TRABAJO FINAL DE LA CARRERA

TÍTULO	Síntesis de bajo impacto ambiental de un preservante de maderas a partir de la Química Verde y evaluación de su actividad antifúngica.
ALUMNO	Nombre y apellido: Elizabeth Haug
DIRECTOR	Dra. Ing. Ftal. Natalia Raffaelli. Profesora Adjunta. Curso Industrias de Transformación Química.
CO-DIRECTOR	Dr. Mario Saparrat. Profesor Adjunto. Curso de Microbiología Agrícola.
ÁREAS DE TRABAJO	Microbiología Agrícola. Departamento de Ciencias Biológicas. Química Orgánica. Departamento de Ciencias Exactas. Protección Forestal. Departamento de Ambiente y Recursos Naturales. Xilotecnología. Departamento de Ingeniería Agrícola y Forestal. Industrias de Transformación Química. Departamento de Ingeniería Agrícola y Forestal.
ENTREGA	La Plata, Febrero de 2019

Contenido

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
OBJETIVO GENERAL.....	8
Objetivos específicos.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
Síntesis del cinamato de metilo.....	9
Material fúngico.....	11
Evaluación de la actividad antifúngica del cinamato de metilo en cultivo agarizado.....	11
Medición y análisis de resultados de ensayo en cultivo agarizado.....	13
Evaluación de la respuesta del hongo al compuesto aplicado en madera.....	13
Medición y análisis de resultados de ensayo sobre madera tratada.....	15
RESULTADOS.....	16
Síntesis del cinamato de metilo.....	16
Evaluación de la actividad antifúngica del cinamato de metilo en cultivo agarizado.....	16
Evaluación de la respuesta del hongo al compuesto aplicado en madera.....	19
DISCUSIÓN.....	21
CONCLUSIONES.....	24
BIBLIOGRAFÍA.....	26
ANEXO.....	31

RESUMEN

La madera constituye un material susceptible a la degradación fúngica, presentando deterioro frecuente y agresivo cuando es puesta en servicio. Si bien a lo largo de los años se han desarrollado compuestos para su protección con diversos métodos de impregnación, muchos presentan fuertes cuestionamientos ambientales. El presente trabajo se focaliza en la obtención de un preservante con potencial actividad antifúngica para maderas mediante Química Verde, intentando reducir o eliminar el uso y generación de sustancias peligrosas en el diseño, manufactura y/o aplicación. Se realizó la síntesis de cinamato de metilo (CiM) a partir de ácido cinámico y metanol, mediante catálisis heterogénea con ácidos de estructura Preyssler, con un rendimiento del 49%. Posteriormente, se evaluó *in-vitro* la acción antifúngica del compuesto frente a *Gloeophyllum sepiarium* (Wulf.: Fr.) P. Karst, hongo causante de pudrición parda. Para ello, se analizó comparativamente el crecimiento del hongo sobre un medio de cultivo agarizado control y en presencia del CiM (de 500 a 4000 ppm), incluyendo un tratamiento de referencia (IPBC 100 ppm), en oscuridad durante 26 días a 22°C y 27°C. A su vez, se evaluó la habilidad de colonización de *G. sepiarium* sobre probetas de madera control e impregnadas con CiM (4500 y 5000 ppm) y el tóxico de referencia (IPBC 100 ppm), registrando el avance del micelio durante 27 días a 24°C. El CiM demostró efecto antifúngico a partir de 2000 ppm a 22°C. Se observó retraso en el crecimiento a partir de 500 ppm (22°C) y 1000 ppm (27°C), y poder inhibitorio a partir de 1000 ppm (44,7% 22°C) y 2000 ppm (39,1% 27°C). A 27°C, la mayor inhibición se verificó a 4000 ppm (57,3%). A pesar de que el CiM aplicado en madera no evidenció acción antifúngica, modificaciones en la metodología de ensayo permitirían verificar su aptitud como potencial preservante verde.

PALABRAS CLAVE: QUÍMICA VERDE, PRESERVANTE, CINAMATO DE METILO.

INTRODUCCIÓN

La madera constituye un material con amplia variedad y aptitud de usos y con ventajas tecnológicas frente a otros materiales. Puede ser utilizada como material estructural, combustible o como materia prima en industrias, en su forma básica inalterada (construcción, mueblería, postes, leña, etc.), o como subproducto (tableros, pulpa, papel, briquetas, etc.). Se encuentra disponible en diversas formas y tamaños; en términos generales, es posible trabajarla con diversas herramientas; presenta gran resistencia en relación al peso, baja conductividad térmica, acústica y eléctrica; dependiendo de las especies, puede presentar alta resistencia a la flexión estática y dinámica y una relativa durabilidad frente a la acción de sustancias químicas o agentes de deterioro atmosférico como los rayos UV, lluvia, etc., con mayor resistencia a la oxidación y corrosión. Además, los cambios dimensionales (contracción e hinchamiento) producto de variaciones de temperatura son despreciables, aunque no lo son frente a cambios en el contenido de humedad.

Sin embargo, presenta susceptibilidad frente a la acción de agentes bióticos de deterioro (hongos, bacterias, insectos y taladradores marinos), viéndose afectadas sus propiedades físicas, químicas, mecánicas y estéticas (Monteoliva, 2009). Si bien las maderas de ciertas especies son naturalmente durables, asociado principalmente a su composición química, en otras maderas no durables resulta necesaria la adopción de medidas conocidas como métodos de preservación, que implican algún proceso de impregnación y permiten protegerlas de la degradación biótica, incrementando su durabilidad (durabilidad adquirida), resistencia, y consecuente vida útil en servicio (Monteoliva, 2009; Murguía, 2012).

La degradación por hongos xilófagos representa las mayores pérdidas en durabilidad y resistencia, ya que son atacados los componentes principales de la pared celular (celulosa,

hemicelulosas y lignina). Según el grado y modo de degradación de los mismos se identifican tres tipos de pudrición: parda o cúbica, blanca o fibrosa y blanda, siendo la primera la más agresiva, ya que reduce considerablemente la vida útil de la madera en servicio; desde los estadios iniciales del proceso, las propiedades de resistencia mecánica disminuyen severamente, no siendo proporcional a la pérdida de peso. La madera con este tipo de pudrición presenta un patrón de fractura cúbico característico -con fisuras paralelas y perpendiculares al grano- y una coloración castaña, producto de la lignina residual luego de haber sido atacadas la celulosa y hemicelulosas; la madera adquiere consistencia frágil y se desintegra fácilmente con la manipulación (Murace *et al.*, 2010) (Figura 1a). En la pudrición blanca, el componente preferentemente atacado es la lignina, otorgando a la madera un color blanquecino procedente del complejo celulósico resultante, con aspecto fibroso; generalmente afecta más a maderas de frondosas que de coníferas, debido a su mayor contenido de lignina y ciertas hemicelulosas (Figura 1b). La pudrición blanda es de menor importancia, desarrollándose generalmente a nivel superficial en maderas en contacto con el suelo; otorgan a las mismas un aspecto final blando o esponjoso (Peraza Sánchez, 2001; Zanni, 2004) (Figura 1c).



Figura 1. Pudrición parda (a), blanca (b) y blanda (c) de la madera. Fuentes: www.uspest.com (a); www.ancientforest.org (b); Luley (2006) (c).

Mediante la aplicación de sustancias preservantes en el interior de la madera, es decir, productos químicos que sean tóxicos para los organismos degradadores pero que no generen daños a la madera, es posible reducir la susceptibilidad de la misma frente a este tipo de degradación biótica (Murguía, 2012).

Actualmente, existen en el mercado numerosos productos utilizados con este fin. Sin embargo, algunos de ellos han sido objeto de restricciones en cuanto a sus aplicaciones y comercialización debido a problemas de seguridad y toxicidad tanto ambiental como para la salud humana, y persistencia en el ambiente. El arseniato de cobre cromatado (CCA) es un compuesto hidrosoluble ampliamente utilizado a escala mundial y nivel industrial por su alta efectividad como antifúngico e insecticida y buena capacidad de fijación, brindando protección a la madera a largo plazo. Aun teniendo buena fijación, con el paso del tiempo y en particular en ambientes ácidos puede ocurrir la lixiviación de sus componentes, entre ellos, el arsénico inorgánico, muy peligroso para la salud. Como ejemplos de compuestos orgánicos óleo-solubles de alta toxicidad y gran poder de penetración se encuentran el pentaclorofenol (PCP) y 2-(tiocianometil) benzotiazol (TCMTB); en el caso del PCP, su fabricación, uso y/o comercialización ha sido prohibido por su elevada peligrosidad para la salud y el ambiente. Si bien muchos países han reemplazado productos por alternativos considerados “menos dañinos”, en ocasiones éstos resultan más costosos y se posee escaso conocimiento respecto a su comportamiento e impacto ambiental. Como ejemplo, se pueden mencionar el compuesto cúprico de amonio cuaternario (ACQ) y el óxido de cromo, cobre y boro (CCB) como reemplazos alternativos del CCA. A raíz de esto, en los últimos años ha ido creciendo el interés por el desarrollo de nuevos compuestos no tóxicos y biodegradables que puedan ser utilizados en la preservación de la madera (Keil, 2004; Murguía, 2012).

En la necesidad de buscar otras alternativas, se ha encontrado que algunos aceites esenciales extraídos de ciertas especies vegetales (particularmente del género *Ocimum*), utilizados como repelentes, insecticidas, antimicrobianos y antioxidantes y que han evidenciado un importante efecto fungitóxico sobre ciertos hongos que afectan a cultivos agrícolas, contienen en su composición una elevada concentración de un derivado del ácido

cinámico: el cinamato de metilo (CiM) (Murillo *et al.*, 2002). Esto último también se verifica en aceites esenciales extraídos de especies del género *Cinnamomum* (Bin Jantan *et al.*, 2008), con elevada actividad antifúngica sobre diversos hongos. Además, existen antecedentes de este compuesto como potente nematocida (Kong *et al.*, 2007) y como repelente de colémbolos micófagos (Hexapoda: Entognatha) -microartrópodos hexápodos- a elevadas concentraciones (Sawahata *et al.*, 2008). Si bien aún no se han hallado pruebas de su utilización como agente antifúngico en madera, podría constituir un potencial principio activo en formulaciones preservantes de bajo impacto ambiental teniendo en cuenta, además, su baja persistencia en el ambiente, baja toxicidad para organismos no blanco, y mayor especificidad en su modo de acción, por tratarse de un compuesto de origen botánico (Pérez *et al.*, 2015).

El CiM puede obtenerse a partir de ciertas especies vegetales que lo sintetizan naturalmente. Sin embargo, para su empleo a gran escala en dichas formulaciones se debe recurrir a la síntesis en laboratorio, a fin de obtener un mayor rendimiento. Para ello, en relación a la búsqueda de alternativas más amigables para la salud humana y el medio ambiente, el uso de la Química Verde presenta claras ventajas respecto a la química tradicional.

La Química Verde sostiene que, mediante el diseño de productos y procesos químicos, aplicando doce principios¹, es posible reducir o eliminar la producción y el uso de

¹ Prevenir la formación de residuos, economía atómica (todos los átomos de los reactivos forman parte de los productos), diseño y uso de metodologías de síntesis que generen productos con toxicidad nula o reducida, generar productos químicos eficaces, pero no tóxicos, reducir el uso de sustancias auxiliares, bajo consumo energético, uso de materias primas renovables, evitar la formación innecesaria de derivados, uso de catalizadores selectivos y reutilizables, generar productos químicos biodegradables, desarrollar metodologías analíticas que permitan la monitorización en tiempo real, previo a la formación de sustancias peligrosas, y minimizar potenciales accidentes químicos (Romanelli, 2013).

sustancias peligrosas para el medio ambiente y la salud humana, teniendo en cuenta desde el inicio del proceso, el posible impacto que puede implicar una nueva sustancia en ambas dimensiones (Romanelli, 2013).

Al momento de definir la factibilidad de uso del CiM como agente preservante en madera, es posible realizar pruebas en laboratorio que permitan evaluar a corto plazo su capacidad antifúngica, en función de la capacidad del agente biológico para colonizar la madera tratada con dicho compuesto.

En base a lo expuesto, en el presente trabajo se plantean las siguientes hipótesis de trabajo:

1. El CiM puede ser sintetizado en laboratorio siguiendo los principios formulados por la Química Verde.
2. A determinada concentración en ensayos en medio de cultivo agarizado, el compuesto puede tener acción antifúngica sobre un hongo de pudrición parda de la madera.
3. La aplicación del CiM a determinada concentración en madera, puede evitar el desarrollo del micelio en la misma.
4. El compuesto aplicado en madera puede actuar como agente preservante, protegiéndola de la degradación fúngica y, por ende, incrementando su durabilidad.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del trabajo fue la síntesis en laboratorio de un compuesto con potencial acción antifúngica en el marco de la Química Verde, para su utilización en la preservación de la madera.

Objetivos específicos

- Evaluar la factibilidad de síntesis con rendimientos aceptables del compuesto químico CiM en laboratorio, mediante la aplicación de los doce principios de la Química Verde.
- Evaluar en medio de cultivo agarizado el comportamiento del hongo causante de pudrición parda *Gloeophyllum sepiarium* (Wulf.: Fr.) P. Karst., frente a dicho compuesto, a distintas concentraciones y temperaturas.
- Evaluar la respuesta del hongo a la presencia del compuesto aplicado en probetas de madera, a través de su frente de colonización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis del CiM

Se evaluó la factibilidad de síntesis en laboratorio del CiM, en el marco de la Química Verde. Para ello, durante todo el proceso se tuvieron en cuenta los doce principios enunciados anteriormente (Romanelli, 2013). Además, se consideraron los costos y disponibilidad de reactivos necesarios, instrumental a utilizar y rendimiento de la reacción², factores determinantes en la posibilidad de producción a gran escala.

Se llevó a cabo mediante síntesis química y en un solo paso la preparación de CiM, a partir de ácido cinámico y metanol, sin utilizar otro solvente y utilizando catálisis heterogénea³ mediante heteropoliácidos sólidos con estructura de Preyssler (APMo, H₁₄NaP₅MoW₂₉O₁₁₀). Esta reacción consiste en una esterificación directa, también conocida

² Cantidad de producto obtenido en relación a la cantidad de producto teóricamente esperable.

³ El catalizador que actúa sobre la velocidad (actividad) y dirección (selectividad) de transformación de los reactivos en productos se encuentra en una fase diferente a la de los mismos (en este ensayo, catalizador en fase sólida y reactivos en fase líquida). Fenómeno catalítico: 1) Difusión de los reactivos a la superficie externa del catalizador; 2) Adsorción de los reactivos sobre puntos activos; 3) Reacción en superficie; 4) Desorción de los productos; 5) Difusión de los productos hacia la fase líquida (Carballo Suárez, 2002).

como esterificación de Fisher (Autino *et al.*, 2013), donde el ácido cinámico reacciona con el metanol, en presencia del heteropoliácido con estructura de Preyssler, formando cinamato de metilo y agua (Figura 2) (Tabla 1).

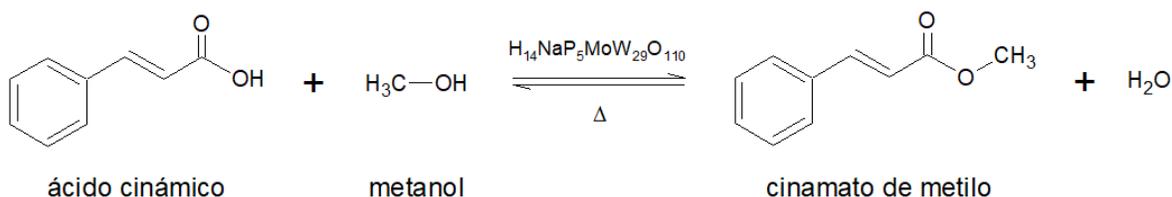


Figura 2. Reacción de síntesis del CiM. Fuente: elaboración propia con ACD/ChemSketch (Freeware) 2.5 (ACD/Labs, 2015).

Tabla 1. Reacción de esterificación de Fisher.

	Compuestos orgánicos	Fórmula empírica	Características
Reactivos	Ácido cinámico	C ₉ H ₈ O ₂	Ácido carboxílico. Apariencia: sólido cristalino de color blanco.
	Metanol	CH ₃ OH	Alcohol. Apariencia: líquido incoloro.
Catalizador	Ácido de Preyssler al 1%	H ₁₄ NaP ₅ MoW ₂₉ O ₁₁₀	Catalizador ácido. Apariencia: sólido de color verde.
Producto	Cinamato de metilo	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	Éster. Apariencia: sólido cristalino de color blanco o transparente.
Temperatura de reacción: 110°C		Tiempo de reacción: 8 horas	

Para ello, se calentaron a reflujo 1 milimol de ácido cinámico, 4 ml de metanol y 80 mg del catalizador con agitación. El final de la reacción se determinó mediante cromatografía en capa delgada. El producto obtenido se extrajo con 2 ml de tolueno y se lavó con porciones de bicarbonato de sodio, NaHCO₃, al 5% y agua destilada. Para secar el extracto, se empleó sulfato de sodio, Na₂SO₄, anhidro y se sometió a cromatografía en columna. Finalmente, el solvente se evaporó en vacío.

Material fúngico

Como agente de deterioro se empleó el hongo causante de pudrición parda *Gloeophyllum sepiarium* (Wulf.: Fr.) P. Karst., aislamiento LPSC 735 (Cepario del Instituto Spegazzini, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP, La Plata), especie frecuentemente asociada al deterioro de la madera puesta en servicio (Murace *et al.*, 2010). Los cultivos stock del hongo en un medio con agar al 2% se mantuvieron en estrías a 4°C siguiendo a Saparrat *et al.* (2002).

Se debe tener presente que, para el objetivo de esta investigación, se ha empleado una cepa de pudrición parda por ser la más agresiva tanto para madera de coníferas como de latifoliadas, además de estar establecido en las normas referentes a determinaciones de durabilidad. Sin embargo, en ensayos de durabilidad de latifoliadas se establece, además, el empleo de cepas de pudrición blanca (normativa europea UNE-UN (350-1,2)⁴ y normativa americana ASTM⁵).

Evaluación de la actividad antifúngica del CiM en cultivo agarizado

El ensayo se realizó inoculando al hongo en un medio de cultivo basal y en presencia del compuesto en cuestión, comparándolo con un tóxico de referencia, en un rango de concentración entre 500 y 4000 ppm, siendo registrado el diámetro de extensión micelial a lo largo de 26 días de incubación bajo oscuridad a distintas temperaturas. Teniendo en

⁴ La normativa europea UNE-UN (350-1,2), entre otras, enumera las normas a utilizar para la determinación de la durabilidad de la madera maciza a campo (UNE 56425-UNE 252) y en laboratorio, dentro de las cuales se encuentran las relacionadas a hongos xilófagos: CEN/TS 15083-1 (Basidiomycetes xilófagos) y CEN/TS 15083-2 (Ascomycetes y hongos imperfectos) (Murace & Spavento, 2014).

⁵ La normativa americana ASTM (American National Standard) incluye normas para la estimación de la resistencia a la degradación fúngica que poseen las maderas sin tratamiento (durabilidad natural) (ASTM D-2017) o bien las tratadas con soluciones preservantes (durabilidad adquirida) (ASTM D 1413) (Murace & Spavento, 2014).

cuenta que *G. sepiarium* es una especie termotolerante (NAPPO, 2014; Zabel, Morrell, 1992), con una temperatura óptima de crecimiento entre los 30-50°C (Alfredsen *et al.*, 2005), se ensayaron temperaturas entre los 20-40°C emulando las temperaturas ambiente comunes en la zona de La Plata, en intervalos definidos en ese rango.

Se utilizó agar-extracto de malta⁶ como medio de cultivo basal (MB) y se prepararon soluciones madre de CiM de 500 a 4000 ppm (a intervalos de 500 ppm), e IPBC (3-yodo-2-propinil butil carbamato, C₈H₁₂INO₂) de 100 ppm, fungicida industrial de uso actual como tóxico de referencia. En todos los casos, se empleó acetona (Ac) como solvente en un volumen de 10 ml. El tóxico de referencia, la Concentración Mínima Inhibitoria del mismo (CMI) y el solvente fueron testeados en ensayos preliminares.

Las soluciones se suplementaron al medio basal y se dispusieron en placas de Petri, conformando 22 tratamientos: 11 cultivos (dos controles negativos, un control positivo y ocho cultivos con CiM) a 2 temperaturas (Tabla 2); cada tratamiento se realizó por triplicado. Las placas se inocularon en el centro con discos de micelio de 0,6 cm de diámetro, obtenidos de cultivos sobre medio agar-extracto de malta. Los cultivos testigo y en presencia del compuesto se incubaron en oscuridad durante 26 días a 22 ±2°C y 27 ±2°C.

Tabla 2. Suplementación de los medios de cultivo utilizados y su denominación.

Nomenclatura	Composición
H2O (Control – a)	MB + 10 ml Agua
Ac (Control – b)	MB + 10 ml Ac
IPBC (Control +)	MB + 10 ml Solución Ac IPBC 100 ppm
CiM 500	MB + 10 ml Solución Ac CiM 500 ppm
CiM 1000	MB + 10 ml Solución Ac CiM 1000 ppm
CiM 1500	MB + 10 ml Solución Ac CiM 1500 ppm
CiM 2000	MB + 10 ml Solución Ac CiM 2000 ppm

⁶ 2% agar, 2% extracto de malta, 0,2% extracto de levadura.

CiM 2500	MB + 10 ml Solución Ac CiM 2500 ppm
CiM 3000	MB + 10 ml Solución Ac CiM 3000 ppm
CiM 3500	MB + 10 ml Solución Ac CiM 3500 ppm
CiM 4000	MB + 10 ml Solución Ac CiM 4000 ppm

Medición y análisis de resultados de ensayo en cultivo agarizado

El crecimiento fúngico y su cinética se estimó en base al diámetro de la extensión miceliar. Se midieron dos diámetros perpendiculares entre sí, tomando como intersección el centro del inóculo, a intervalos de 24-72 horas durante 26 días. El diámetro medio se calculó en base al promedio de ambas mediciones.

Previa constatación de supuestos estadísticos, se realizó análisis de la varianza de manera de evaluar diferencias entre los tratamientos ($p < 0,05$). Para analizar el efecto de los distintos tratamientos en el crecimiento miceliar, se trabajó con los datos correspondientes a la fase de crecimiento lineal. La tasa de crecimiento K (cm/día), definida como $K = (Dp_1 - Dp_0) / (t_1 - t_0)$ donde Dp_0 y Dp_1 es el diámetro promedio a tiempo t_0 y t_1 respectivamente, se calculó estimando la pendiente de la recta de regresión lineal del diámetro promedio de la colonia Dp (cm) versus el tiempo de incubación t (días), mediante el software de análisis estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2014). La fase de latencia λ (días) se obtuvo mediante extrapolación lineal de la fase de crecimiento considerada al diámetro inicial de la colonia (Baldrian & Gabriel, 2002; Liberto & Saparrat, 2005).

Evaluación de la respuesta del hongo al compuesto aplicado en madera

El ensayo se realizó siguiendo la metodología reportada por Zhang *et al.* (2016). Para ello se inoculó el hongo en probetas de madera, obtenidas a partir de varillas comerciales ofrecidas en el mercado como *Populus* sp. (Salicáceas), tratadas con el compuesto en análisis, comparándolo con un tóxico de referencia, a concentraciones de 4500 y 5000 ppm,

registrando el frente de avance del micelio a lo largo de 27 días de incubación bajo oscuridad a una temperatura dada.

Se emplearon 10 probetas de madera de 8 mm x 1 mm y 10 cm de longitud, graduadas cada 1 cm, con contenido de humedad de equilibrio higroscópico (HEH). El solvente utilizado para la preparación de las soluciones y el tóxico de referencia coincidieron con los empleados en el ensayo previo.

Se llevaron a cabo 5 tratamientos (dos controles negativos, un control positivo y dos tratamientos con CiM) para los cuales, las probetas fueron tratadas mediante inmersión durante 5 minutos en agua, solvente y cada una de las soluciones (Tabla 3). Las probetas tratadas se secaron hasta alcanzar la HEH ($15 \pm 2\%$; Spavento *et al.*, 2008) y se inocularon en la base con discos de micelio de 0,6 cm de diámetro, obtenidos de cultivos sobre medio agar-extracto de malta. Luego, se colocaron en tubos de ensayos con 1 ml de agar-agua⁷ en el fondo del mismo y papel de filtro humedecido en la tapa, para mantener la humedad en el sistema (Figura 3). Se realizaron 10 réplicas por tratamiento. Los tubos fueron incubados durante 27 días en oscuridad a $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Tabla 3. Tratamientos químicos aplicados a las probetas de madera y su denominación.

Nomenclatura	Composición
H₂O (Control – a)	Agua
Ac (Control – b)	Ac
IPBC (Control +)	Solución Ac IPBC 100 ppm
CiM 4500	Solución Ac CiM 4500 ppm
CiM 5000	Solución Ac CiM 5000 ppm

⁷ La presencia de una fuente de humedad (agar-agua) cercana a la madera, permite a los hongos de pudrición colonizar, humedecer y posteriormente degradar la madera cuando el contenido de humedad de la misma es inferior al Punto de Saturación de las Fibras (PSF, ~30% -humedad óptima-) (Stienen *et al.*, 2014).



Figura 3. Sistema de estudio.

Medición y análisis de resultados de ensayo sobre madera tratada

La capacidad de colonización se estimó mediante el registro de la distancia recorrida por el frente de avance miceliar, a intervalos de 2-5 días durante 27 días.

Previa constatación de supuestos estadísticos, se realizó análisis de la varianza de manera de evaluar diferencias entre los tratamientos empleando el software de análisis estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2014). Ante diferencias significativas ($p < 0,05$), se aplicó el test de comparación de medias de Tukey.

RESULTADOS

Síntesis del cinamato de metilo

El rendimiento obtenido de CiM fue del 49%. Si bien es relativamente bajo en comparación con rendimientos obtenidos mediante la síntesis verde de otros compuestos con potencial uso en la preservación de maderas (superiores al 90%) (Murguía, 2012), la aplicación de los principios de la Química Verde resultó viable en la síntesis del CiM y permitió obtener un rendimiento aceptable.

Para llevar a cabo la reacción no fue necesaria la utilización de un solvente, ya que uno de los reactivos (metanol) cumplió esa función; se realizó en un solo paso; todos los átomos presentes en los reactivos formaron parte de los productos, los cuales son biodegradables, no persistentes en el ambiente y de baja toxicidad; no se generaron productos residuales y el catalizador pudo recuperarse fácilmente para ser reutilizado.

Evaluación de la actividad antifúngica del CiM en cultivo agarizado

El CiM ejerció un efecto fungistático⁸ sobre *G. sepiarium*, limitando el crecimiento del micelio fúngico a medida que aumentó su concentración en el medio (Figuras 4a y 4b) (Tabla 4), existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,001$).

⁸ Para corroborar el tipo de efecto antifúngico (fungicida o fungistático) que ejerce el CiM sobre *G. sepiarium*, los discos de micelio de los tratamientos con CiM donde no se registró crecimiento fueron sembrados en placas con medio de cultivo basal. Al cabo de una semana, se registró un crecimiento similar al observado en los controles negativos (datos no mostrados).

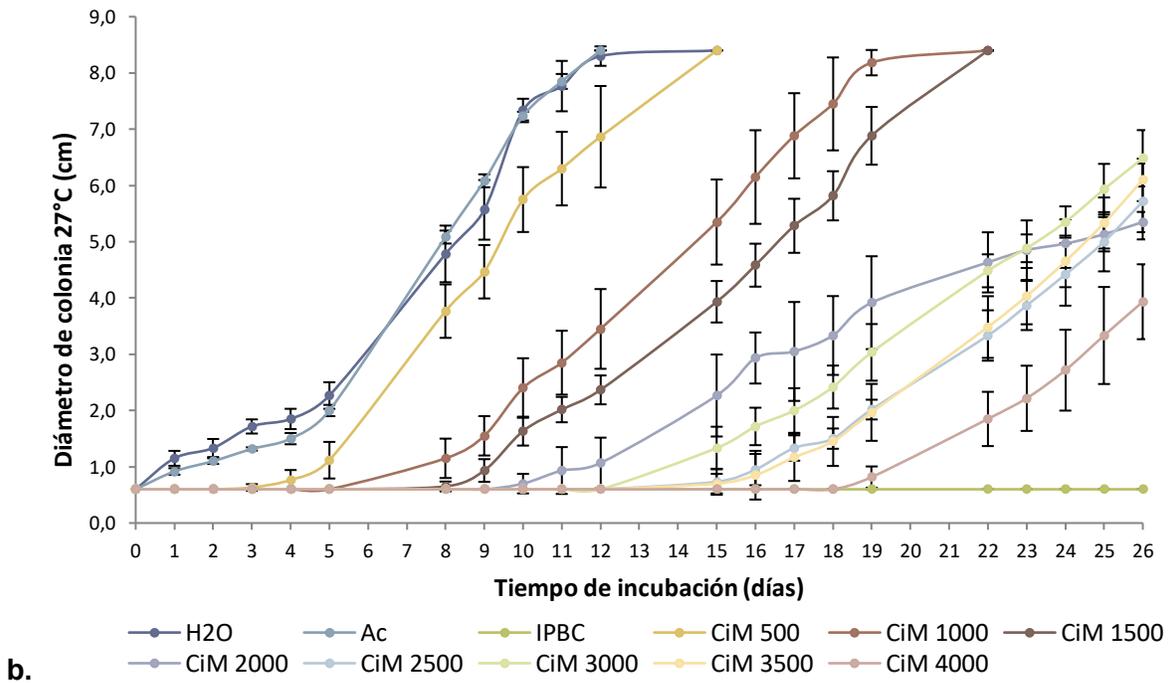
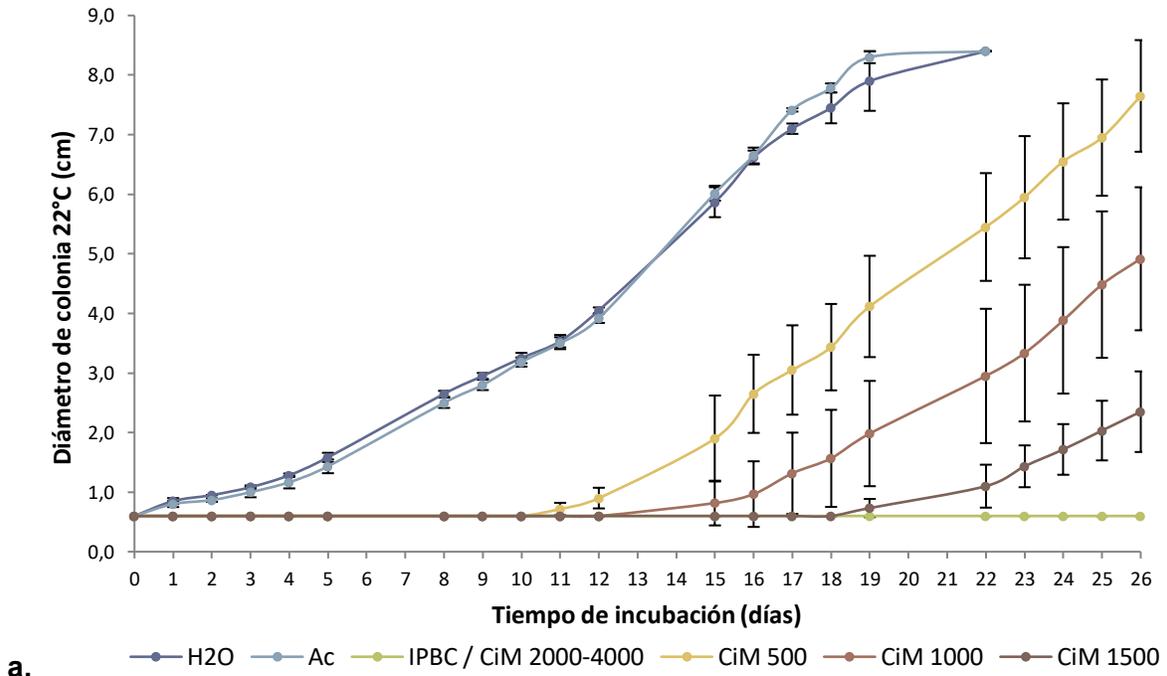


Figura 4. Cinética de crecimiento micelial de *G. sepiarium* en medios control (agua y acetona) y en presencia de CiM a 500-4000 ppm, e IPBC a 100 ppm a 22°C (a) y 27°C (b). Los datos registrados y barras de error (Desviación Estándar) corresponden a tres réplicas.

Tabla 4. Parámetros estadísticos de las rectas de regresión lineal entre el diámetro de las colonias de *G. sepiarium* sobre medios control (agua y acetona) y en presencia de CiM a 500-4000 ppm, e IPBC a 100 ppm (variable dependiente) versus el tiempo de incubación (variable independiente).

Tratamiento	K (cm/día)		λ (días)	
	22°C	27°C	22°C	27°C
H2O (Control – a)	0,483	0,905	4,0	3,2
Ac (Control – b)	0,525	0,998	4,6	3,5
IPBC (Control +)	-	-	-	-
CM 500	0,487	0,742	11,9	3,8
CM 1000	0,388	0,646	15,4	7,4
CM 1500	0,235	0,571	19,1	8,6
CM 2000	-	0,313	-	9,5
CM 2500	-	0,451	-	15,4
CM 3000	-	0,441	-	13,2
CM 3500	-	0,497	-	15,7
CM 4000	-	0,441	-	18,9

(-): no se registró crecimiento.

A diferencia de los controles negativos, donde se evidenció crecimiento del micelio desde el inicio del ensayo, en los tratamientos con CiM éste se vio retardado y la tasa de crecimiento resultó menor. Se observó que, a medida que aumentó la concentración del compuesto en el medio, la fase de latencia se extendió y la tasa de crecimiento disminuyó. Lo contrario ocurrió teniendo en cuenta la temperatura, donde se registró un acortamiento de la fase de latencia e incremento de la tasa de crecimiento al aumentar la misma. No se registró crecimiento del micelio en los tratamientos de mayor concentración de CiM (2000 a 4000 ppm) a 22°C y en el control positivo.

A 22°C, el CiM demostró efecto antifúngico a partir de 2000 ppm (Concentración Mínima Inhibitoria, CMI), observando un retraso del crecimiento a partir de 500 ppm, que sólo fue evidente luego de 12 días respecto a las colonias sobre el medio de cultivo basal. Se comenzó a registrar poder inhibitorio a partir de 1000 ppm, con un valor del 44,7%. A 27°C, el crecimiento se vio retardado a partir de 1000 ppm, visualizándose transcurridos los 7

días de iniciado el ensayo. Se registró inhibición a partir de 2000 ppm, con un valor del 39,1%, y el mayor poder inhibitorio se verificó a 4000 ppm, con un valor del 57,3% (Figuras 7 y 8, Ver Anexo).

No se observaron diferencias en las características y morfología de la colonia fúngica en los tratamientos con CiM respecto a los controles negativos, aunque sí se evidenció mayor variabilidad en el crecimiento en diámetro entre réplicas de un mismo tratamiento.

Evaluación de la respuesta del hongo al compuesto aplicado en madera

El CiM no ejerció un efecto fungistático sobre *G. sepiarium*, aun empleando concentraciones mayores a las consideradas en el ensayo en medio de cultivo agarizado y una temperatura de ensayo próxima a los 22°C.

Si bien los tratamientos con CiM registraron crecimiento del micelio fúngico desde inicios del ensayo, no se encontraron diferencias significativas en avance y características del mismo con respecto a los controles negativos ($p > 0.05$). En el control positivo no se observó crecimiento. Por otro lado, no se evidenciaron diferencias de color entre las probetas tratadas con CiM y las probetas control (Figuras 5 y 6).

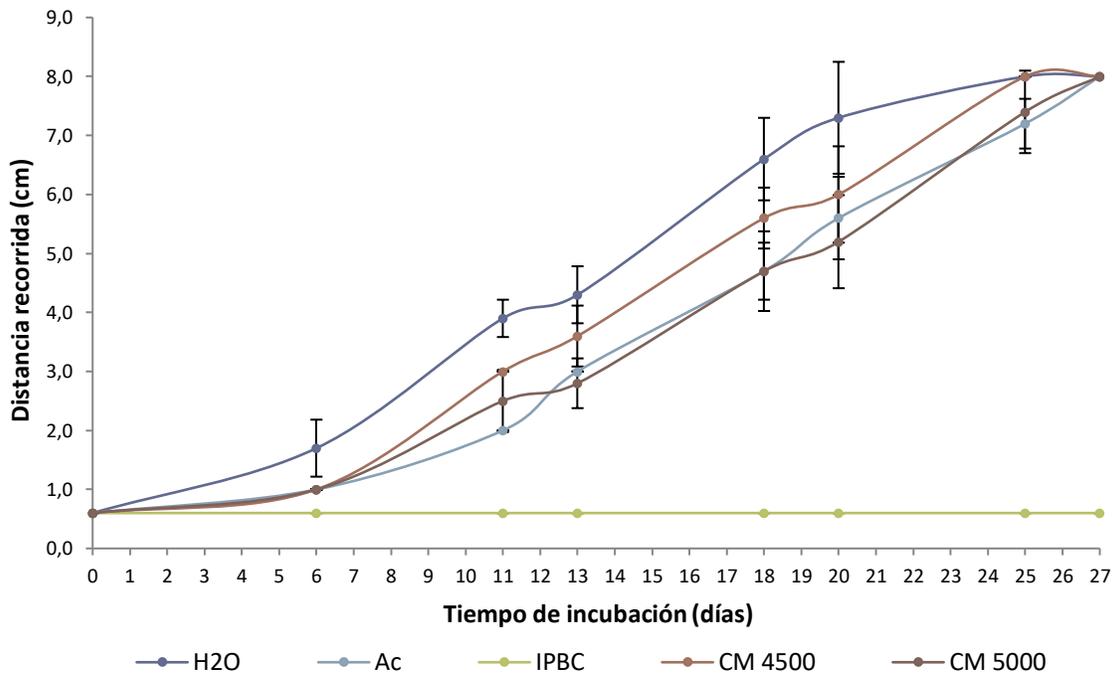


Figura 5. Cinética del frente de avance del micelio de *G. sepiarium* sobre las probetas de madera expuestas a los tratamientos químicos en función de los días de incubación. Los datos registrados y barras de error (Desviación Estándar) corresponden a diez réplicas.

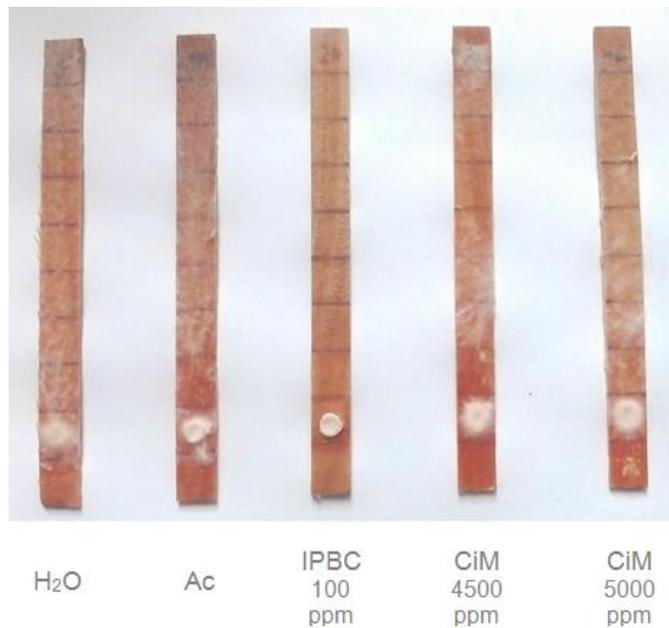


Figura 6. Colonización de probetas de madera control y expuestas a los agentes químicos analizados luego de 27 días de incubación.

DISCUSIÓN

En este trabajo se ha estudiado la síntesis de CiM mediante Química Verde y su evaluación como antifúngico, utilizando a *G. sepiarium* como organismo test a controlar, tanto en cultivos agarizados como en probetas de madera.

Aunque se logró sintetizar el CiM empleando Química Verde, los rendimientos alcanzados fueron relativamente bajos (49%). Utilizando la misma metodología, Pérez *et al.* (2015) han sintetizado derivados del ácido cinámico y obtuvieron rendimientos menores para el cinamato de metilo (30%), atribuyendo estos valores a limitaciones condicionadas por la temperatura de reacción debido al punto de ebullición del metanol (64,7°C). En este sentido, la síntesis de cinamato de propilo vía este procedimiento alcanzó rendimientos del 95%, siendo el punto de ebullición de *n*-propanol de 97°C. Puesto que Murguía (2012) reportó rendimientos superiores al 90% en la síntesis verde de dos compuestos con potencial uso en la preservación de maderas, sustratos alternativos y/o variantes de reacción deberían ser considerados para incrementar los rendimientos obtenidos de CiM.

El uso de catalizadores heteropoliácidos sólidos como los de Preyssler que operen en fase heterogénea, constituyen una alternativa prometedora en la síntesis empleando Química Verde, ya que generan una reducida cantidad de residuos y productos secundarios, siendo posible su recuperación mediante simple filtración y lavado y reutilización sin pérdida apreciable de su actividad catalítica. Esto reemplaza el uso de ácidos minerales solubles, cuyo desecho generan residuos contaminantes (Pérez *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2009). En cuando al fenómeno que ocurre en la catálisis heterogénea, éste se desarrolla en la superficie externa del catalizador, lo que determina sus propiedades químicas. La presencia de un átomo de molibdeno en la estructura del catalizador ácido APMo modifica su simetría, lo que aumenta su acidez y favorece la reacción química (Pérez *et al.*, 2015). Por ello, la

utilización de catalizadores de Preyssler en la síntesis de CiM puede constituir una estrategia para la obtención de un preservante de maderas.

En el ensayo del hongo sobre medio agarizado, el efecto del CiM sobre el crecimiento de *G. sepiarium* se evaluó analizando la fase de latencia y la tasa de crecimiento de la fase lineal. Teniendo en cuenta la temperatura como un parámetro físico que condiciona el crecimiento de los hongos, se observó la respuesta diferencial del CiM en su acción inhibitoria sobre el crecimiento de *G. sepiarium* en función de la temperatura de incubación, con reducción de la fase de latencia, aumento de la tasa de crecimiento y menores porcentajes de inhibición al incrementar la temperatura. Dado que en las condiciones de ensayo el compuesto es estable, el comportamiento diferencial sugiere una activación térmica del metabolismo del hongo a temperaturas próximas al rango de crecimiento óptimo para *G. sepiarium* (30-50°C) (Alfredsen *et al.*, 2005). A la vez, una mayor disponibilidad de humedad, producto de la mayor evaporación en el sistema de estudio (cajas de Petri), podría generar mejores condiciones de crecimiento para el desarrollo de micelio (Stienen *et al.*, 2014).

El CiM ejerció un control sobre el crecimiento del hongo, retardando el crecimiento, con menor tasa, y mayor porcentaje de inhibición al aumentar su concentración en el medio. A 22°C, el CiM demostró efecto antifúngico a partir de 2000 ppm, con retraso del crecimiento (12 días) a partir de 500 ppm y poder inhibitorio a partir de 1000 ppm (44,7%). A 27°C, el crecimiento se ve retardado (7 días) a partir de 1000 ppm, con inhibición a partir de 2000 ppm (39,1%) y mayor poder inhibitorio a 4000 ppm (57,3%). Hay reportes sobre la utilización de CiM con distintos fines a menores concentraciones de trabajo. Bin Jantan *et al.* (2008) hallaron una elevada actividad antifúngica sobre hongos no xilófagos por parte del CiM extraído de aceites esenciales de especies del género *Cinnamomum*, con CMI de 630 ppm. Sobre otros organismos, el CiM tiene un efecto tóxico también a concentraciones inferiores,

actuando como potente nematocida, con valores de LC_{50}^9 de 163 ppm (Kong *et al.*, 2007) y repeliendo colémbolos micófagos a partir de 100 ppm con inhibición incompleta pero significativa y fuerte inhibición a partir de 1000 ppm (Sawahata *et al.*, 2008). Comparando estos resultados con los obtenidos en este trabajo y en trabajos previos (Haug *et al.*, 2016), se observa que la acción antifúngica del CiM sobre *G. sepiarium* se da a elevadas concentraciones. Esto podría deberse a la existencia de mecanismos detoxificadores de este compuesto por el hongo. Existen reportes sobre la capacidad de algunos hongos de pudrición parda para degradar ciertos compuestos aromáticos. Jawallapersand *et al.* (2014) hacen referencia a la existencia de enzimas con actividad monooxigenasas del complejo P450 de la familia CYP53, con un rol importante en la degradación de compuestos aromáticos y detoxificación de compuestos tóxicos y moléculas intermediarias resultantes, como el benzoato¹⁰, siendo dicho complejo esencial para la supervivencia de los mismos. Hongos pardos como *Postia placenta* (Zhang *et al.*, 2016), *Tyromyces palustris* y *Gloeophyllum trabeum* (Kamada *et al.*, 2002) (Basidiomycota), cuentan con este sistema, con capacidad de metabolizar compuestos endógenos y exógenos mediante reacciones de hidroxilación.

No se detectó acción fungistática del compuesto aplicado en probetas de madera, obtenidas a partir de varillas comerciales de *Populus* sp. mediante inmersión. Sin embargo, en pruebas preliminares empleando la misma metodología (condiciones de crecimiento, tratamientos y

⁹ Concentración letal del compuesto que provocaría la muerte del 50% de la población del experimento, que se exponga durante un cierto período a dicho compuesto.

¹⁰ El benzoato se encuentra presente en plantas como compuesto antifúngico, y a la vez constituye un intermediario en la degradación de compuestos aromáticos en hongos. Resulta tóxico para los mismos ya que provoca la ruptura de la membrana celular, inhibiendo procesos celulares esenciales, cambiando el balance de pH e induciendo respuestas de estrés en hongos (Jawallapersand *et al.*, 2014).

probetas) y otro método de impregnación, como la tindalización¹¹, se evidenció un menor crecimiento del micelio (datos no mostrados). Por lo tanto, resulta necesaria la repetición del mismo empleando otros métodos de aplicación del compuesto en las probetas de madera. Por otro lado, teniendo en cuenta que este estudio constituye una aproximación inicial de la respuesta del hongo al CiM aplicado en madera, se recomienda la evaluación de la eficiencia del compuesto, mediante una valoración gravimétrica a través del porcentaje de pérdida de peso establecido por las normas referentes a determinaciones de durabilidad de la madera, para confirmar los resultados sobre el potencial del CiM como un agente controlador de hongos causantes de pudrición parda.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La síntesis del CiM mediante la Química Verde es viable y conlleva numerosas ventajas en comparación con la química tradicional, como la economía atómica, la no utilización de sustancias auxiliares como solventes, la formación de productos biodegradables y de baja toxicidad, entre otros. A pesar que el rendimiento del CiM resultó relativamente bajo en comparación con rendimientos de otros compuestos sintetizados mediante Química Verde, es mayor a los que se obtendrían naturalmente a partir de especies vegetales que lo sintetizan.

Según los ensayos realizados hasta el momento, el compuesto demuestra actividad antifúngica en un hongo cultivado en medio agarizado a una concentración de 2000 ppm a 22°C. Teniendo en cuenta que la temperatura resultó ser un factor importante sobre la dinámica de crecimiento del hongo, es una variable a tener en cuenta en ensayos futuros.

Si bien no se detectó acción fungistática del compuesto aplicado en probetas de madera, resulta necesario plantear nuevos ensayos, ya sea empleando otro tipo de probetas

¹¹ A presión atmosférica y 100°C.

de madera (especie, tamaño, forma), realizando un mayor número de repeticiones, modificando la técnica de aplicación del compuesto sobre el material, y/o utilizando otra metodología de determinación (por ejemplo, mediante porcentaje de pérdida de peso), para evaluar diferencias y dar mayor sustento a los resultados.

Si bien el compuesto ha sido ensayado en un hongo causante de pudrición castaña, resultaría interesante analizar el efecto que puede tener sobre hongos xilófagos causantes de los otros dos tipos de pudriciones.

Los resultados obtenidos hasta el momento indican un comportamiento promisorio del compuesto sintetizado, y requerirán de investigaciones posteriores, fundamentalmente sobre madera, para poder obtener resultados más fehacientes que determinen que el CiM pueda ser utilizado como un preservante verde.

BIBLIOGRAFÍA

ACD/Labs. (2015). Software de modelado molecular ACD/ChemSketch (Freeware) 2.5. Advanced Chemistry Development, Inc.

Alfredsen, G.; Solheim, H. & Jenssen, K. M. (2005). Evaluation of decay fungi in Norwegian buildings. International Research Group on Wood Protection. India. IRG/WP 05-10562, 12 pp.

Ancient Forest Exploration & Research. Giving thanks for forest fungi by Michael Henry (posted in 2015). Disponible en: <http://www.ancientforest.org/giving-thanks-for-forest-fungi/>.
Último acceso: junio 2018.

Autino, J.C.; Romanelli, G. P. & Ruiz, D. M. (2013). Introducción a la química orgánica. Ed. Eulp. La Plata, Argentina. 426 pp.

Baldrian, P. & Gabriel, J. (2002). Intraspecific variability in growth response to cadmium of the wood-rotting fungus *Piptoporus betulinus*. *Mycologia*, 94(3), 2002. pp. 428–436.

Bin Jantan, I; Moharam, B. A. K.; Santhanam, J & Jamal, J. A. (2008). Correlation Between Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oils of Eight *Cinnamomum* Species. *Pharmaceutical Biology*, 2008, Vol. 46, No. 6, pp. 406–412.

Carballo Suárez, L. M. (2002). Introducción a la catálisis heterogénea. Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp. 1-12.

Di Rienzo, J. A.; Balzarini, M.; González, L.; Casanoves, F.; Tablada, M. & Robledo, C. W. (2016). Software estadístico InfoStat. Universidad Nacional de Córdoba (FCA-UNC).

Haug, E.; Raffaelli, N.; Romanelli, G.; Ruiz, D.; Saparrat, M. & Keil, G. D. (2016). Síntesis de Bajo Impacto Ambiental de un Preservante de Maderas a partir de la Química Verde. V

Congreso Iberoamericano de Protección de la Madera. Colonia de Sacramento, Uruguay. 9 pp.

Jawallapersand, P; Mashele, S. S.; Kovac̃ic̃, L.; Stojan, J.; Komel, R.; Pakala, S. B.; Kras̃evec, N. & Syed; K. (2014). Cytochrome P450 Monooxygenase CYP53 Family in Fungi: Comparative Structural and Evolutionary Analysis and Its Role as a Common Alternative Anti-Fungal Drug Target. PLoS ONE 9(9): e107209. 15 pp.

Kamada, F., Abe, S., Hiratsuka, N., Wariishi, H., & Tanaka, H. (2002). Mineralization of aromatic compounds by brown-rot basidiomycetes—mechanisms involved in initial attack on the aromatic ring. Microbiology, 148(6), 1939-1946.

Keil, G. D. (2004). Biodegradación y Preservación de la Madera: Sustancias Preservantes. Curso de Actualización para Graduados, Universidad Nacional del Comahue. 9 pp.

Kong, J-O.; Lee, S-M.; Moon, Y-S.; Lee, S-G. & Ahn; Y-J. (2007). Nematicidal Activity of Cassia and Cinnamon Oil Compounds and Related Compounds toward *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). Journal of Nematology 39(1):31–36.

Liberto, R. & Saparrat, M. (2005). Crecimiento y habilidad decolorante potencial de *Hyphomycetes (Deuteromycetes)* de Río Santiago sobre medio agarizado suplementado con cromóforos sintéticos. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, 40 (3-4): 145 - 150. 2005.

Luley, C. J. (2006). Identificación del tipo de pudrición de la madera y hongos xilófagos en árboles urbanos. Arborist News. Disponible en: <http://www.dbbe.fcen.uba.ar/contenido/objetos/Identifictipodepudric.pdf>. 14 pp. Último ingreso: mayo 2018.

Monteoliva, S. (2009). La madera: propiedades y productos forestales. Apunte de Cátedra de Xilotecología, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales – UNLP. 13 pp.

Murace, M. & Spavento, E. (2014). Durabilidad de las maderas. Apunte de Cátedra de Xilotecología, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales – UNLP. 10 pp.

Murace, M.; Spavento, E.; Keil, G. D. & Saparrat, M. (2010). Pudrición castaña: efectos sobre las propiedades de resistencia mecánica de la madera. Revista de Ciencias Forestales – Quebracho Vol. 18 (1,2):37-46.

Murguía, M. C. (2012). Desarrollo de nuevos productos para la preservación de maderas. Acta de III Congreso Iberoamericano de Protección de la Madera (CIPROMAD). Concepción, Chile. 10 pp.

Murillo, E.; Viña, A. & Correa I. L. (2002). Actividad antifúngica y composición química del aceite esencial de doce variedades de *Ocimum* sp. cultivadas en Ibaguè – Colombia. Información Tecnológica – Vol. 13 N° 1.

North American Plant Protection Organization (NAPPO) (2014). Review of heat treatment of wood and wood packaging. NAPPO Science and Technology Documents. pp. 7-8.

Peraza Sánchez, F. (2001). Protección preventiva de la madera. Disponible en: http://infomadera.net/uploads/publicaciones/pdf_91_8487381227.pdf. pp. 48-51. Último ingreso: mayo 2018.

Pérez, M. E.; Ruiz, D.; Pasquale, G.; Barberis, F.; Schneider, M. I.; Romanelli, G. P. & Autino, J. C. (2015). Preparación de cinamatos de alquilo en condiciones de bajo impacto ambiental. I Jornadas de Jóvenes Investigadores del CISaV. Revista Investigación Joven Vol. 2 (1) (2015). pp. 33.

- Pérez, M. E.; Ruiz, D.; Romanelli, G. P.; Schneider, M. I. & Autino, J. C.** (2013). Bioactividad de derivados naturales del ácido cinámico. XIX Simposio Nacional de Química Orgánica. Disponible en: http://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=05420&inst=yes&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=2195821. Último acceso: mayo 2018.
- Romanelli, G. P.** (2013). Material de Curso de Química Verde: retos para un desarrollo sostenible. Universidad del Cauca. Popayán, Colombia.
- Ruiz, D.; Romanelli, G.; Vázquez, P. & Autino, J.** (2009). Catálisis con heteropoliácidos con estructura de Preyssler. Aplicación en la síntesis de fenilpropanoides. VI Simposio Colombiano de Catálisis. Medellín, Colombia. 5 pp.
- Saparrat, M. C. N.; Martínez, M. J.; Cabello, M. N. & Arambarri, A. M.** (2002). Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strain from Argentina isolated from different substrata. *Revista Iberoamericana de Micología* 19:181-185.
- Sawahata, T.; Shimano, S. & Suzuki, M.** (2008). *Tricholoma matsutake* 1-ocen-3-ol and methyl cinnamate repel mycophagous *Proisotoma minuta* (Collembola: Insecta). *Mycorrhiza* (2008) 18:111–114.
- Spavento, E.; Keil, G. D. & Monteoliva, S.** (2008). Propiedades físicas de la madera. Apunte de Cátedra de Xilotecnología, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales – UNLP. 29 pp.
- Stienen, T.; Schmidt, O. & Huckfeldt, T.** (2014). Wood decay by indoor basidiomycetes at different moisture and temperature. *Holzforschung*, 68(1), 9-15.
- U.S. Pest Protection.** Wood destroying fungi: Brown rot. Disponible en: <https://uspest.com/pest-identifier/brown-rot/>. Último acceso: junio 2018.

Zabel, R. A. & Morrell, J. J. (1992). Wood Microbiology: Decay and Its Prevention. Academic Press, Inc. USA. pp. 106.

Zanni, E. (2004). Patología de la madera: Degradación y Rehabilitación de Estructuras de Madera 1era Edición. Facultad de Arquitectura, Urbanismo y Diseño – UNC. Ed. Brujas. Córdoba. pp. 110-113.

Zhang, J.; Presley, G. N.; Hammel, K. E.; Ryud, J-S; Menkee, J. R.; Figueroaf, M.; Hug, D.; Orrg, G. & Schillinga, J. S. (2016). Localizing gene regulation reveals a staggered wood decay mechanism for the brown rot fungus *Postia placenta*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 113(39), 10968-10973.

ANEXO

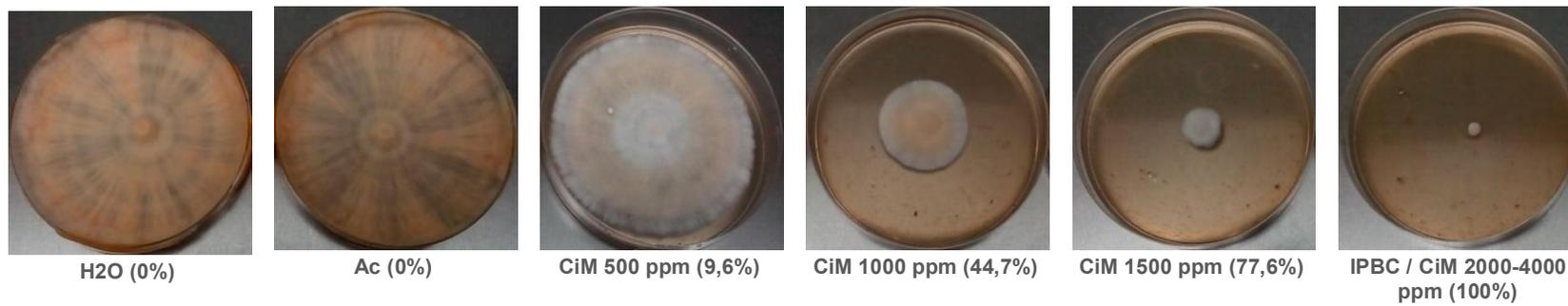


Figura 7. Crecimiento micelial de la réplica más representativa del Dp de cada tratamiento a 22°C a los 26 días de incubación. El porcentaje de inhibición indicado corresponde al promedio de las tres réplicas.

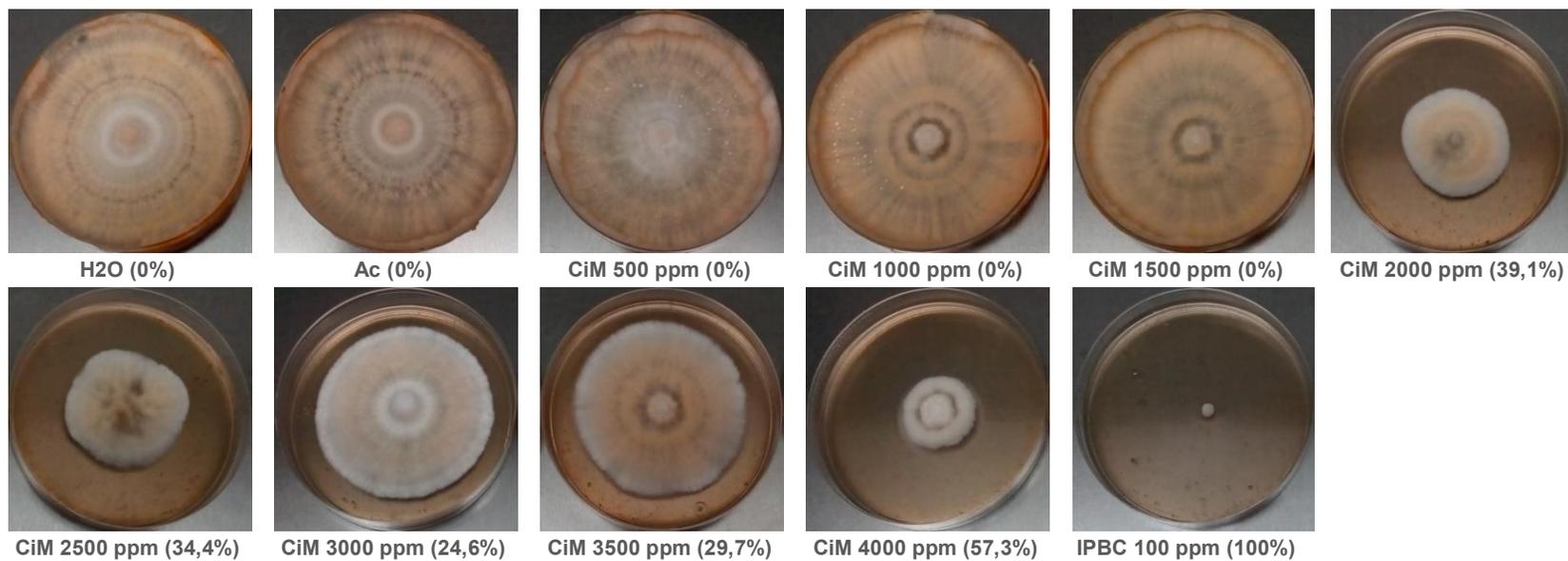


Figura 8. Crecimiento micelial de la réplica más representativa del Dp de cada tratamiento a 27°C a los 26 días de incubación. El porcentaje de inhibición indicado corresponde al promedio de las tres réplicas.