



**TEBUCONAZOL VEHICULIZADO EN MICELAS POLIMÉRICAS:
CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL FORMULADO y EVALUACIÓN DE SU EFECTIVIDAD
FRENTE A LA DEGRADACIÓN FÚNGICA DE LA MADERA**

Alumno: Gastón Sartor

Director: Ing. Ftal. Msc. Dr. Alejandro Lucia

Codirector: Dra. Mónica Murace

Fecha de entrega: 06/03/2020

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y caracterizar de manera fisicoquímica un formulado experimental conteniendo tebuconazol vehiculizado en micelas poliméricas y evaluar su efectividad contra la degradación fúngica de la madera. En el desarrollo del formulado experimental, el Tebuconazol (funguicida) fue solubilizado en eugenol y disperso en agua mediante un polímero biodegradable (Poloxamer 407). La caracterización fisicoquímica fue realizada sobre el formulado experimental y sus correspondientes diluciones (mezclas de impregnación). Inicialmente se determinó la densidad en el formulado experimental, como así también la distribución del tamaño de las micelas poliméricas y su estabilidad a temperaturas y tiempos diferentes (5 y 25°; 24hs, 3 y 6 meses). La estabilidad fue determinada por dispersión de luz dinámica (DLS), la densidad a partir de alícuotas de 0,5 y 1ml del formulado y la viscosidad de las mezclas de impregnación en copa de flujo. La efectividad frente a la degradación fúngica (durabilidad) fue estimada mediante norma CEN/TS 15083-1:2005 en madera de *Populus* sp tratada por vacío-presión. Se evaluó la retención indirecta del tebuconazol en la madera tratada mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). En términos generales el formulado mostró una adecuada estabilidad en las diferentes condiciones de tiempo y temperatura y una densidad ligeramente superior a la del agua. Por otro lado, los valores de viscosidad de las mezclas de impregnación fueron inferiores a la del agua. La madera tratada con las dos dosis aumentó su clase de durabilidad en dos categorías (de poco durable a muy durable), en correspondencia con la distribución homogénea del tebuconazol en pequeñas micelas de 30 nm en la mezcla de impregnación y su retención en la madera en el orden del 40%. Estos resultados sugieren que es posible desarrollar plataformas de dispersión de funguicidas que brinden una adecuada protección en la madera y que representen potenciales alternativas más amigables con el ambiente.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	4
OBJETIVO GENERAL.....	8
OBJETIVOS PARTICULARES.....	8
HIPÓTESIS DE TRABAJO	8
MATERIALES Y MÉTODOS	
A- Desarrollo del formulado experimental (Impregnante)	9
B- Densidad del formulado experimental (Impregnante)	9
C- Distribución del tamaño de las micelas poliméricas mediante DLS.....	9
D- Viscosidad cinemática de las diluciones obtenidas (Mezclas de Impregnación).....	10
E- Material leñoso.....	11
F- Determinación indirecta de la retención del Tebuconazol en la madera	13
H- Instalación de los ensayos de biodegradación – procedimiento.....	14
G- Cepas xilófagas	16
I- Análisis estadístico.....	17
RESULTADOS	
1- Caracterización fisicoquímica del formulado experimental (Impregnante).....	18
1.a) Distribución del tamaño de las micelas poliméricas del formulado mediante DLS.....	18
1.b) Densidad del formulado experimental	19
2- Preparación de la mezclas de impregnación (Dosis 1 y 2)	19
2.a) Viscosidad cinemática de las mezclas de impregnación	19
2.b) Distribución del tamaño de las micelas poliméricas mediante DLS.....	20

3) Determinación indirecta de la retención de Tebuconazol en la madera impregnada.....	21
4) Estimación de la resistencia a la biodegradación.....	26
DISCUSION.....	29
CONCLUSIONES.....	33
BIBLIOGRAFÍA.....	34
AGRADECIMIENTOS.....	37
APENDICES	38

INTRODUCCIÓN

La madera en servicio está expuesta a la acción de agentes bióticos y abióticos de deterioro en grado diverso en función de su situación de uso. La superficie de la madera de uso exterior y sin protección es afectada por un deterioro físico y químico lento provocado por las condiciones ambientales o intemperismo (Chang et al., 1982). Bajo estas circunstancias, además, entre los agentes bióticos posibles de atacarla se encuentran los hongos xilófagos considerados responsables del tipo de deterioro más frecuente y agresivo que pueda presentarse en la madera (Highley, 1987). La degradación fúngica resulta de la descomposición ectoenzimática de los componentes principales de la pared celular: celulosa, hemicelulosas y lignina. La destrucción de estos polímeros afecta negativamente las propiedades físico-mecánicas del material en períodos de tiempo relativamente cortos y, a causa de ello, disminuye su vida útil en servicio (Zabel & Morrell, 1992; Schmidt, 2006). En este marco, el desafío a superar consiste en incrementar la resistencia de la madera a la degradación fúngica (durabilidad) mediante estrategias que ofrezcan máxima efectividad con el menor impacto ambiental (Lebow, 2010). El tratamiento químico constituye una estrategia de aumento de la vida útil de las maderas expuestas a situaciones favorables para que ocurra este tipo de deterioro. El grado de protección alcanzado depende, entre otros, de la naturaleza del preservante como también de la penetración y retención lograda en el material, parámetros influenciados por el método de

preservación (Lebow, 2010). En este sentido, el tratamiento mediante vacío-presión es una de las técnicas más utilizadas y efectivas para prevenir la acción de los hongos xilófagos.

En el campo del tratamiento químico de la madera, el tebuconazol y propiconazol - funguicidas ampliamente utilizados en la agricultura (Loughman y Thomas, 1992; Cabras et al., 1997) - son incorporados en formulaciones comerciales de preservantes de madera desde hace más de una década (PTI, ESR-1721, ESR-2067, ESR-2325, ESR-2240).

El tebuconazol formulado como único ingrediente activo o bien en combinación con otros (Woo et al., 2010; Buschhaus y Valcke, 1995), ha demostrado proteger adecuadamente a la madera de este tipo de deterioro. Este funguicida con acción preventiva, curativa y erradicante interfiere en la biosíntesis de la membrana celular fúngica, inhibiendo la formación de ergosterol (Joseph-Horne et al., 1995) y a causa de ello limita el crecimiento y la esporulación de los hongos (Reinprecht, 2010), pudiendo provocar la muerte de este tipo de organismos (Eaton y Hale, 1993). Este funguicida presenta una toxicidad moderada para mamíferos, con una DL_{50} de 1700 mg/kg en ratas y se encuentra aprobado en combinación con otros activos para su uso como preservante de madera en diferentes países (EEUU, Chile, Reino Unido y Nueva Zelanda). Entre los nombres comerciales de los productos formulados que contienen tebuconazol para el tratamiento de madera podemos mencionar a Vacsol[®] Azure., Wolman[®] VA y Wood Preserver. No obstante, dicho principio activo (pa) presenta una adecuada solubilidad en agua -36 mg/litro (20 °C)- lo que lo hace susceptible al lavado (lixiviado), lo cual, sumado a su moderada toxicidad para los organismos de suelo, determina que sea considerado por la directiva 98/8/EC de la comunidad Europea como un producto químico que debe ser expuesto a revisiones periódicas para ser usado como preservante de madera.

El tebuconazol, como así también otras moléculas biológicamente activas, no se venden al público tal como se obtienen del proceso de síntesis química industrial; éstas son comercializadas como un formulado o producto comercial (Fishel, 2011). El formulado (o formulación) consiste en una mezcla constituida por un ingrediente activo (i.a), y por componentes llamados inertes. El i.a posee la propiedad intrínseca de ocasionar el efecto deseado, pudiendo prevenir, matar o repeler una plaga

(Fishel, 2010). Los ingredientes inertes se incluyen en el producto/formulado por varias razones: a- para mejorar la actividad del producto; b- facilitar su aplicación; c- facilitar su dilución en agua; d- ayudar a adherir o esparcir el producto sobre superficies; e- ayudar a transportar el producto a la plaga objetivo y f- mantener su estabilidad durante el almacenamiento (Fishel, 2011). En los últimos años, el empleo de sistemas de transporte de moléculas bioactivas (o i.a) con alta especificidad, actividad prolongada en el lugar de aplicación y disminución de su toxicidad, ha sido un modelo ideal que está tratando de alcanzarse por medio de numerosas investigaciones (McClements, 2015). Las emulsiones han sido uno de los sistemas más estudiados en las últimas décadas, ya que son considerados sistemas que pueden encapsular moléculas activas (Cole y Whateley, 1997; Laugel et al., 1998; Hino et al., 2000; Tedajo et al., 2005).

Las emulsiones pueden considerarse dispersiones coloidales en las que un líquido se dispersa como gotas (fase dispersa) en otro líquido inmisible (fase fluida continua). Esta dispersión se estabiliza mediante compuestos denominados tensioactivos (McClements, 2005).

Dentro de este contexto, las emulsiones (formulaciones líquidas) basadas en copolímeros tribloques han sido utilizadas en esta última década para desarrollar nanotransportadores de drogas en el ámbito farmacológico. Los copolímeros tribloque están basados en una estructura de un bloque lipofílico central de poli (óxido de propileno) y dos bloques hidrofílicos periféricos de poli (óxido de etileno). Estos copolímeros pueden ser usados para obtener micelas poliméricas o geles para el desarrollo de diferentes sistemas portadores de drogas (Alexandridis et al., 1996; Ivanova et al., 2000; Batrakova et al., 2006). En esta última década, los copolímeros tribloque han sido utilizados para el desarrollo de geles debido a su capacidad para modificar la difusión del fármaco (liberación del fármaco) o su alta capacidad de encapsulación (Sharma et al., 2008). Recientemente, en el campo de las formulaciones utilizadas para el control de insectos, el copolímero tribloque conocido comercialmente como Pluronic[®] 127 (Poloxamer 407) ha sido utilizado para obtener micelas poliméricas y/o geles con el fin de reducir o retardar la penetración de DEET (repelente de insectos) a través de la piel humana (Barradas et al., 2013).

A partir de la información disponible en el ámbito de la farmacotecnia, Lucia et al. (2017) diseñaron y caracterizaron micelas poliméricas conteniendo componentes de aceites esenciales en su núcleo hidrofóbico. Estos resultados aportaron información respecto del tipo de interacción que genera este núcleo lipofílico y la posibilidad de vehiculizar moléculas con actividad insecticida de bajo impacto ambiental y baja toxicidad sobre mamíferos (Lucia et al., 2018). En este sentido se pudo identificar que algunos monoterpenos aromáticos, como el eugenol, permiten la solubilización de compuestos altamente lipofílicos para la posterior incorporación en micelas poliméricas de tamaño nanométrico dispersas en agua. Estas micelas conteniendo eugenol (que actúan como transportadores al encapsular al tebuconazol) se encuentran dispersas en agua, por lo cual se puede definir a este sistema en su conjunto como una emulsión o/w (aceite/agua).

En base a los antecedentes enunciados se considera que estas emulsiones o/w deberían atenuar el impacto ambiental, brindando adicionalmente una mayor seguridad toxicológica para el agente manipulador y aplicador del producto, como también debería disminuir el riesgo de incendio en el proceso de formulación y almacenaje en comparación con un concentrado emulsionable convencional. Esto último es debido a la sustitución de los solventes orgánicos de las formulaciones convencionales por el agua, el eugenol (un componente del aceite esencial del clavo de olor) y un copolímero tribloque biodegradable y biocompatible (Poloxamer 407). Por otro lado, conocer cuál es el tamaño de las micelas poliméricas y cómo evoluciona su estabilidad en el tiempo, tanto en el formulado como en la dilución de aplicación, es de vital importancia para su aplicación y eficacia. Asimismo, conocer parámetros como la densidad del formulado o la viscosidad cinemática de la mezcla de impregnación podría explicarnos en mayor o menor medida la dificultad o facilidad de dicha mezcla para ingresar en la madera.

En resumen, esta tesis se centra en el diseño, desarrollo, caracterización y evaluación de la actividad fungicida de micelas poliméricas nanométricas dispersas en agua, que actúan como sistemas transportadores del fungicida tebuconazol. Es importante destacar que el desarrollo de

esta técnica podría tener también un potencial impacto positivo en la industria veterinaria, agropecuaria y farmacológica.

OBJETIVO GENERAL:

Desarrollar y caracterizar de manera físico-química un formulado experimental constituido por tebuconazol vehiculizado en micelas poliméricas y evaluar su efectividad contra la degradación fúngica de la madera.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- a) Determinar la densidad de la formulación.
- b) Caracterizar mediante dispersión de luz dinámica (DLS) la distribución del tamaño de las micelas poliméricas contenedoras del Tebuconazol que conforman el formulado, al término de 24 hs de su fabricación.
- c) Determinar, mediante DLS, la estabilidad del formulado a lo largo del tiempo (0, 3 y 6 meses) a 5 y 25 °C, como también de sus respectivas diluciones en agua simulando las 2 posibles dosis a emplear comercialmente.
- d) Determinar la viscosidad cinemática de las dos diluciones obtenidas previa a la impregnación.
- e) Determinar la retención indirecta del tebuconazol en la madera impregnada con cada una de las dosis evaluadas.
- f) Determinar la efectividad del formulado contra la degradación fúngica de la madera mediante ensayos estandarizados en laboratorio, testeando las dos diluciones como posibles dosis a utilizar comercialmente (ensayos de durabilidad adquirida).

HIPÓTESIS DE TRABAJO:

- a) La densidad de la formulación difiere con respecto a la del agua, su componente mayoritario.

- b) La dispersión del tebuconazol en agua mediante el sistema poloxamer-eugenol presenta una distribución homogénea y de tamaño nanométrico.
- c) La estabilidad del formulado depende del tiempo y de la temperatura de almacenamiento como así también de su dilución en agua, dilución previa al momento de aplicación.
- d) La viscosidad cinemática de las dos diluciones obtenidas previa a la impregnación depende de la dosis y su valor difiere del valor del agua.
- e) El tebuconazol es retenido en la madera impregnada; la retención es directamente proporcional a la dosis evaluada.
- f) La madera de *Populus* sp. impregnada con Tebuconazol incrementa su resistencia a la degradación fúngica.

MATERIALES Y MÉTODOS

A- Desarrollo del formulado experimental (Impregnante). El formulado experimental fue diseñado para que pueda dispersarse en agua. Las micelas poliméricas que lo constituyen actúan como nanosistemas transportadores del tebuconazol (i.a). La emulsión lograda presenta una concentración de 1,5 % p/v de tebuconazol (pureza 98%, provisto por DIRETH SRL), 4 % p/v de eugenol (pureza 99%, agente solubilizador del p.a. para su incorporación en las micelas) y 7,5 % p/v de Poloxamer 407 (polímero biodegradable y biocompatible, también conocido como Pluronic® F-127) (Figura 1). Dicho poloxamer es un copolímero tribloque formado por dos bloques laterales de poli (óxido de etileno) (PEO) y un bloque central de poli (óxido de propileno) (PPO), siendo el número de monómeros alrededor 101 y 56 para bloques PEO y PPO, respectivamente. Esto conduce a una fórmula promedio $[PEO_{101}PPO_{56}PEO_{101}]$ y un peso molecular promedio de 12.5 kDa. La emulsión se preparó utilizando agua desionizada ultrapura (calidad Milli-Q). El procedimiento para la obtención del formulado final no puede ser descripto, ya que se encuentra en etapa de patentamiento (Lucia et. al., 2018).

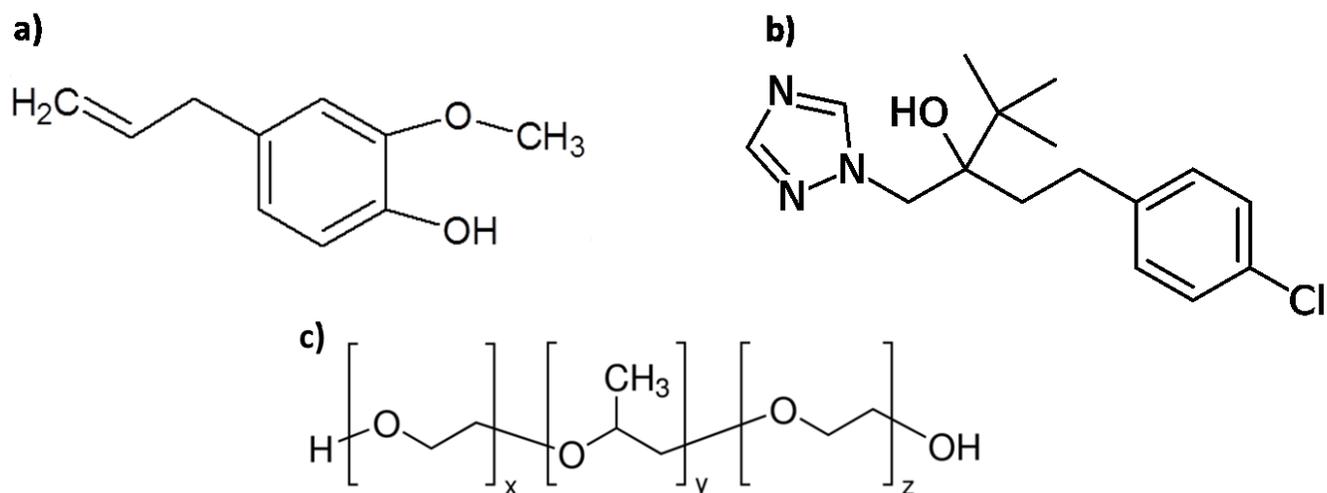


Figura 1: Estructura química de las diferentes moléculas utilizadas: eugenol (a), tebuconazol (b) y poloxamer 407 (c). El subíndice representa el número de monómeros, siendo X: PEO₁₀₁; Y: PPO₅₆; Z: PEO₁₀₁.

B- Densidad del formulado experimental (Impregnante). La densidad es una propiedad básica de cualquier líquido, y se define como la masa por unidad de volumen (g/ml o g/cm³). La densidad fue determinada mediante la pesada de alícuotas de 0,5 y 1 ml del formulado experimental a 25°C. Las alícuotas fueron tomadas con jeringa *Gastight*[™] (Hamilton[™]) y posteriormente pesadas en balanza analítica. Este procedimiento fue repetido 5 veces para cada volumen medido (0,5 y 1 ml). Se utilizó agua (densidad 0.998 g/ml) para calibrar el método debido a que es el principal componente de la formulación.

C- Determinación de la distribución del tamaño de las micelas poliméricas mediante dispersión de luz dinámica (DLS). Uno de los métodos más utilizados para determinar el tamaño de gota en las emulsiones es la dispersión dinámica de la luz (o DLS, por sus siglas en inglés). La técnica DLS sienta sus bases en la dispersión de la radiación incidente, procedente de un láser, sobre una suspensión coloidal. La DLS es particularmente útil para medir los cambios producidos durante el procesamiento o almacenamiento de emulsiones ya que puede detectar si se produce una agregación (síntoma de desestabilización) y estudiar los cambios en tiempo real (Dalglish, 2004). El tiempo de medición fue de 30 segundos (s). Las muestras se analizaron por triplicado. Se determinó la distribución del tamaño de micelas en: **a-** El formulado y sus diluciones (dosis 1 y 2) transcurridas 24 horas de su fabricación; **b-** El formulado y sus diluciones transcurridos 3 y 6 meses de su

fabricación (mantenido a 25 °C y 5 °C). Estos datos permitieron conocer con certeza por cuánto tiempo y en qué condiciones el sistema logrado puede ser almacenado sin sufrir cambios hasta el momento de su utilización. Estas mediciones se llevaron a cabo en el Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA, UNLP). Plataforma de Servicios Científicos y Tecnológicos NanoBioSens, mediante un equipo Zetasizer Nano (Nano ZSizer-ZEN3600, Malvern. U.K.), bajo el régimen de servicios a terceros que ofrece dicha Institución.

D- Viscosidad cinemática de las diluciones obtenidas (Mezclas de Impregnación). Para llevar a cabo las mediciones de viscosidad se utilizó una copa de flujo de viscosidad FORD/ASTM D1200 N°2 (Figura 2). La viscosidad cinemática medida fue expresada en segundos (s) de tiempo de flujo. El procedimiento consistió en medir el tiempo que tardaron las dos diluciones y el agua (utilizada como control) en drenar a través de un orificio ubicado en el fondo de la copa. La medición fue realizada a 25°C, repitiéndose 5 veces.



Figura 2: Izquierda: copa de flujo de viscosidad FORD/ASTM D1200 experimental. Medio y derecha: Formulado experimental fluyendo a través de la copa Ford. Medición del tiempo que tarda en fluir.

E- Material leñoso. Se trabajó con madera de *Populus x canadensis* I-214 proveniente de 10 ejemplares seleccionados al azar, pertenecientes a plantaciones comerciales de 15 años de edad, ubicadas en la localidad de Pomona (39°29'40.74"S; 65°35'28.01"O), Río Negro, Argentina. El material fue recepcionado en forma de vigas (50 mm x 150 mm x 2400 mm) y acondicionado en laboratorio LIMAD (FCAYF, UNLP) hasta alcanzar contenido de humedad en equilibrio higroscópico (HEH), constatado mediante xilohigrómetro digital marca GANN. Lograda la HEH, fue cortado bajo la forma de piezas de 20 mm x 20 mm x 160 mm de largo (Figura 3). Parte de esta madera fue impregnada en autoclave, en planta piloto perteneciente a la empresa Química Bosques S.A. (Apéndice 1) y el resto fue utilizado como material testigo. En cuanto a la impregnación, se trabajó con dos dosis diseñadas a partir del uso del tebuconazol para el manejo de otro tipo de enfermedades fúngicas.

De la totalidad de las piezas (tratadas y no tratadas) fueron obtenidas probetas de 20 mm de lado, libres de defectos, que fueron utilizadas para el establecimiento de los ensayos de biodegradación y para evaluar la retención directa del tebuconazol (i.a). Probetas de igual tamaño fueron obtenidas de listones de haya sin tratamiento (*Fagus sylvatica* L.) a fin de su empleo en la instalación de los ensayos de degradación de referencia (ER) según lo indica la norma CEN/TS 15083-1:2005. Los resultados obtenidos mediante los ER permitieron dar validez a los ensayos de durabilidad y determinar la clase de resistencia al deterioro de la madera del álamo tratada y testigo (EN 350: 2016). Se trabajó con un total de 240 probetas, cuya distribución se presenta en la Tabla 1.



Figura 3: Listones de madera de *Populus x canadensis* I-214 de 20mm x 20mm x 160mm utilizados para la obtención de las probetas de los ensayos de durabilidad

Tabla 1. Tipo y distribución del material utilizado para el establecimiento de los ensayos de durabilidad (norma CEN/TS 15083).

Madera	Categorías experimentales	Ensayo de Durabilidad	
		<i>Gloeophyllum sepiarium</i> ¹	<i>Pycnoporus sanguineus</i> ²
Haya	Ensayo de Referencia	30	30
Álamo I 214	Testigo	30	30
Álamo I 214	Dosis 1 (50 ml en 2000 ml) ³	30	30
Álamo I 214	Dosis 2 (100 ml en 2000 ml) ³	30	30
Total		120	120

Referencias: **1.** Cepa xilófaga responsable de pudrición castaña. **2.** Cepa xilófaga responsable de pudrición blanca. **3.** Dosis, refiere a la dilución final del formulado en la mezcla de impregnación.

F- Determinación indirecta de la retención del tebuconazol en la madera. La cuantificación indirecta del tebuconazol retenido en la madera se determinó a partir de la diferencia entre la concentración del tebuconazol en la mezcla de impregnación inicial y la concentración del mismo durante y al final del proceso de impregnación. De acuerdo con ello, para llevar a cabo dicha cuantificación se tomaron muestras de la mezcla de impregnación durante tres momentos del proceso.

- I. **Mezcla de impregnación inicial.** Dicha muestra fue tomada en el momento de la dilución del formulado experimental en agua, previo a la incorporación en autoclave. Si bien la concentración teórica de dicha muestra es conocida, ésta fue determinada experimentalmente a fin de corroborar y validar el proceso de extracción del tebuconazol en la dispersión y evaluar si la muestra se encuentra dispersa de manera homogénea en la totalidad de la mezcla.

- II. **Mezcla Recuperada (Sin vacío Final).** La muestra fue obtenida en la mitad del proceso de impregnación, después de generar presión de 3 kg/cm² durante 15 minutos y reducir la presión hasta 1 atm. (Paso 6 del Procedimiento. Ver Apéndice 1)
- III. **Mezcla Recuperada (Con vacío Final).** La misma se obtuvo al final del proceso de impregnación, luego de realizar el vacío final de 650 mm Hg durante dos minutos (líquido de drenado final).

La recuperación del tebuconazol en los líquidos se llevó a cabo mediante extracción líquido-líquido y su cuantificación mediante cromatografía gaseosa acoplada a un detector de espectrometría de masas. La extracción líquido-líquido involucró los pasos siguientes: 2,5 ml de cloruro de metileno fueron incorporados a un volumen igual de la muestra analizada (preservante); se agitó durante 3 minutos (Vortex); se aplicó ultrasonido durante 30 minutos; se dejó la mezcla en reposo por 12 h; posteriormente fue expuesta 3 m a vortex y luego fue retirado el cloruro de metileno conteniendo solubilizado al tebuconazol. Se realizaron duplicados de extracción de cada muestra (es decir, muestra I, II y III pertenecientes a los distintos momentos del proceso de impregnación). La cuantificación del tebuconazol recuperado se realizó utilizando un cromatógrafo gaseoso (GC-2010) con detector de espectrometría de masas (QP2010) (Shimadzu, Kyoto, Japón) en modo de impacto electrónico (70 eV). Las muestras fueron analizadas en una columna capilar GC apolar DB-5 (30 m x 0,25 mm di y espesor 0,25 µm) (J & W Scientific, Folsom, CA). El espectrómetro de masas escaneó en el rango m/z 40-400. Para la determinación cuantitativa se usó la técnica del ion total. Se calcularon las áreas de los picos absolutos y se construyó una curva de calibración trazando el área del pico de tebuconazol grado técnico (pureza 98%) versus la concentración de tebuconazol usando un modelo de regresión lineal (R^2 : 0,99). Usando esta curva de calibración, se obtuvo la cantidad de tebuconazol en 2,5 ml (volumen utilizado para la extracción del tebuconazol total en los 2,5 ml de muestra). El coeficiente de variación promedio obtenido para todas las inyecciones por GC-MS fue de 5,3 %.

Para determinar la concentración de tebuconazol en la mezcla retenida para cada etapa del proceso (Inicial, Sin Vacío Final y Con Vacío Final) se siguió la formula número 1:

$$(1) \quad C_{\text{Tebuconazol}} \text{ en Mezcla Retenida (mg/ml): } (C_i \times V_i) - (C_{M \text{ NO Retenida}} \times V_{M \text{ NO Retenida}}) / V_{M \text{ Retenida}}$$

Donde;

C_i : Concentración Inicial, expresada en mg/ml.

V_i : Volumen inicial de la mezcla de impregnación, expresado en ml.

$C_{M \text{ NO Ret}}$: Concentración de la mezcla no retenida, expresada en mg/ml.

$V_{M \text{ NO Ret}}$: Volumen de la mezcla no retenida, expresada en ml.

$V_{M \text{ Ret}}$: Volumen de la mezcla retenida, expresada en ml.

A partir del valor de la concentración del tebuconazol en la mezcla retenida, su volumen y el peso de la madera se puede estimar la cantidad de tebuconazol retenida por gramo de madera.

G- Instalación de los ensayos de biodegradación – procedimiento. Los ensayos fueron realizados según norma CEN/TS 15083-1:2005 con modificaciones en cuanto al tamaño de las probetas y las cepas xilófagas. Se trabajó con frascos de vidrio (frascos de cultivo: fc) de 150 cm³ de capacidad, en los que fueron colocados 40 cm³ de medio agar-malta (AM) (composición: 20 g agar y 25 g extracto de malta cada 1000 cm³). Dispensado el medio, cada fc fue cerrado con tapón de algodón y esterilizado en autoclave durante 20 min a 120 °C y 1^{1/2} atm de presión. Culminada esta etapa, se procedió a la inoculación de los fc mediante trozos de micelio obtenidos con sacabocado (5 mm de diámetro) y posteriormente, a su incubación a 22 °C ± 2 y 70 ± 5 % HR (Figura 4). Una vez que el tejido fúngico cubrió el medio de cultivo, en cada fc fueron incorporadas las probetas de ensayo (2 por frasco) previa determinación de su peso seco inicial (P_{si}) y esterilización en autoclave según lo descrito (excepto el tratado). El material quedó expuesto a la acción de las cepas xilófagas durante 16 semanas en cámara acondicionada (22 °C y 70% HR). Transcurrido este período, se procedió a la extracción de las probetas, a su acondicionamiento (eliminación del micelio superficial) y posterior colocación en estufa a 30 °C ± 2 para obtener su peso seco final (P_{sf}). El peso seco inicial y el final de cada probeta permitió calcular su porcentaje de pérdida de peso (Fórmula 2) y

posteriormente obtener un valor promedio de pérdida de peso (Pp%) por especie botánica y condición (Tabla 1).

$$Pp (\%) = (P_{si} - P_{sf} / P_{sf}) \times 100 \quad (2)$$

Donde:

Pp: pérdida de peso, en %.

P_{si}: peso seco inicial, en gramos.

P_{sf}: peso seco final, en gramos.

Según se indicó, el porcentaje medio de pérdida de peso obtenido para el ensayo de referencia (realizado con haya) permitió validar el ensayo ($Pp\% > 20\%$), como así también determinar la clase de resistencia a la degradación fúngica del material de álamo testigo e impregnado; dicho valor es necesario para la determinación del coeficiente x (Fórmula 3), cuyo valor permite determinar tipo de durabilidad (EN 350., 2016; Tabla 2).

$$X = Pp (\%) \text{ del material del ensayo} / Pp (\%) \text{ del material de referencia} \quad (3)$$

Tabla 2. Clase de durabilidad frente al ataque de hongos xilófagos según el valor de x.

Clase de durabilidad (UNE 350)	Descripción	Resultados expresados en función de x
1	Muy durable	$x \leq 0,15$
2	Durable	$> 0,15 \ x \leq 0,30$
3	Medianamente durable	$> 0,30 \ x \leq 0,60$
4	Poco durable	$> 0,60 \ x \leq 0,90$
5	No durable	$> 0,90$

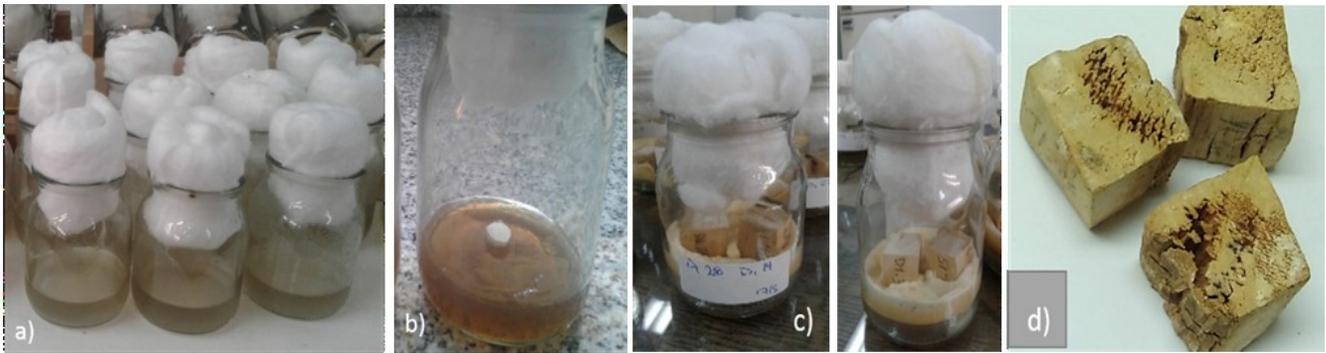


Figura 4: a) Frascos de cultivo previo al inicio del ensayo, b) Inoculación con trozo de micelio obtenido con sacabocado (5 mm diam.), c) Madera expuesta a la acción de *G. sepiarium*, d) Aspecto de la madera testigo expuesta a pudrición castaña al término del ensayo.

H- Cepas xilófagas. Las cepas xilófagas utilizadas para el establecimiento de los ensayos de durabilidad fueron *Gloeophyllum sepiarium* (Wulf.: Fr.) P. Karst. y *Pycnoporus sanguineus* (L.) Murrill responsables de pudrición castaña y blanca, respectivamente. Las cepas fueron obtenidas del Instituto C. Spegazzini (UNLP), repicadas en cajas de Petri con agar extracto de malta (AM) al 2% e incubadas durante 10 días a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$. En esta etapa del trabajo, el objetivo fue reunir la cantidad de inóculo necesaria para el establecimiento de los ensayos previstos (Tabla 1).

I- Análisis estadístico. Para cada grupo de datos, el supuesto de normalidad fue analizado mediante el test Kolmogorov-Smirnov (Statgraphics) o Shapiro-Wilk (Origin 8.0) y la homocedasticidad de las varianzas mediante la prueba de Bartlett's y de Cochran's (Statgraphics). El tamaño de las micelas fue caracterizado mediante la curva de distribución en intensidad, que finalmente nos brinda el diámetro promedio del agregado. El desvío del valor se refiere a la desviación de las diferentes medidas realizadas. Para el análisis de los datos de densidad, las diferencias significativas entre medias fueron analizadas mediante el test t de Student para dos muestras independientes con un nivel de significancia del 5 %. Para los valores de viscosidad cinemática y pérdida de peso, las diferencias significativas entre categorías experimentales/tratamientos fueron analizadas mediante un ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples de medias (Tukey) con un nivel de significancia del 5%. Los valores referidos a la pérdida de peso (%) fueron inicialmente

transformados aplicando el logaritmo natural a los grupos de datos para poder ser analizados mediante este método.

RESULTADOS

1- Caracterización fisicoquímica del formulado experimental (Impregnante)

1.a) Distribución del tamaño de las micelas poliméricas del formulado mediante dispersión de luz dinámica (DLS). Estudio de su estabilidad a diferentes temperaturas y tiempos de almacenamiento. El formulado experimental almacenado durante tiempos y a temperaturas distintas se caracterizó por presentar dos poblaciones de micelas bien definidas. Una primera población presentó un diámetro hidrodinámico aparente promedio que osciló entre 27,51 y 32,11 nanómetros, sólo ligeramente diferente entre las diferentes condiciones (24 hs, 3 y 6 meses a 5 °C y 25 °C). La segunda población de micelas presentó un diámetro hidrodinámico aparente promedio que osciló entre los 615 y 1107 nm.

Estos resultados son representados mediante las funciones de autocorrelación y las distribuciones de tamaño promedio de las micelas (\approx agregados) obtenidos mediante dispersión de luz dinámica (DLS) (Apéndice 2). En las figuras del Apéndice 2 se puede observar el desplazamiento del tiempo de caída o relajación de las funciones de autocorrelación a valores de tiempo que se traducen finalmente en emulsiones con dos poblaciones de micelas bien definidas, presentando finalmente un claro carácter bimodal. Al cabo de 24 hs de almacenamiento, fue determinada una primera población mayoritaria de micelas con un diámetro de $27,51 \pm 0,18$ nm (77%) y una población minoritaria (23%) de $984,5 \pm 56,8$ nm.

Al término de 3 meses de almacenamiento se observó que la primera población se mantuvo prácticamente sin variación para las muestras conservadas a 5°C y 25°C; $27,81 \pm 0,29$ nm y $28,46 \pm 0,55$ nm, respectivamente. La segunda población modificó ligeramente su tamaño, mostrando un diámetro promedio de las micelas de $615 \pm 3,16$ nm para la muestra almacenada a 5°C y de $1107 \pm 10,89$ nm para aquella de 25°C.

Al término de los 6 meses de almacenamiento se identificó igual tendencia en la muestra conservada a 5°C, no obstante, la muestra almacenada a 25 °C presentó una población mayoritaria con un diámetro promedio aparente de $28,06 \pm 0,21$ nm (88,1%).

1.b) Densidad del formulado experimental. En la Figura 5 se observa el valor de la densidad del formulado experimental y del agua a 25°C. El valor de densidad del formulado experimental es ligeramente mayor que la densidad del agua ($p_{\text{value}} < 0.05$), mostrando un valor promedio de 1,07 g/cm³.

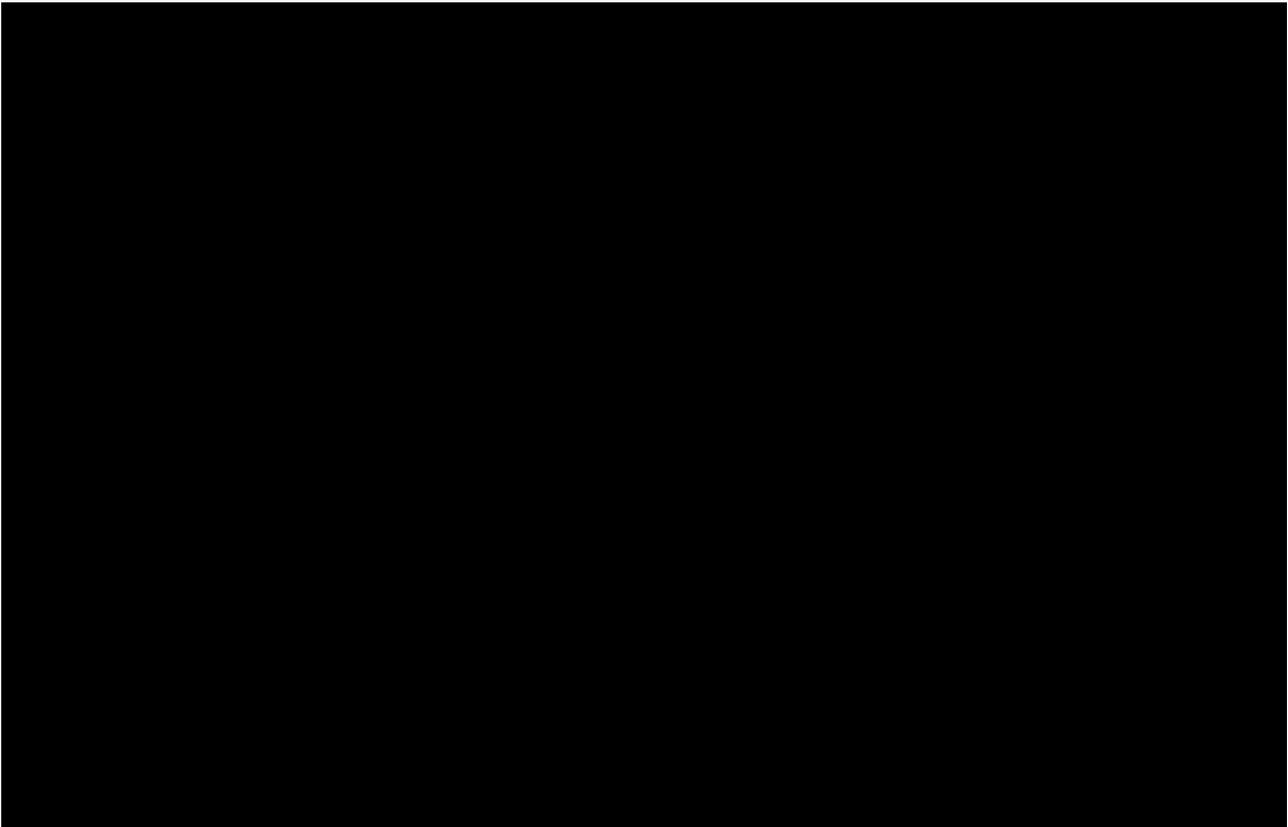


Figura 5. Densidad del agua y del formulado experimental antes de ser diluido en agua. Cada valor representa la media de 5 réplicas independientes con su respectivo intervalo de confianza al 95%. Las diferentes letras sobre los puntos indican diferencias significativas entre las medias según el test de *t* de Student para $p < 0.05$.

2- Preparación de la mezclas de impregnación (Dosis 1 y 2)

El formulado experimental fue diluido en agua a razón de 50 ml y 100 ml (fase dispersa) en 2000ml de agua (fase continua) para las dosis 1 y 2 respectivamente. Estas diluciones, además de utilizarse

para el tratamiento de la madera, fueron sometidas a la evaluación de su viscosidad cinemática y la distribución de tamaño de las micelas poliméricas.

2.a) Viscosidad cinemática de las diluciones obtenidas. La viscosidad cinemática del agua fue levemente mayor cuando fue comparada con las dos diluciones del formulado preparadas para la impregnación de la madera ($p_{\text{value}} < 0,05$), tardando 26,38 segundos en fluir a través de la copa. Asimismo, las diluciones impregnantes no fueron significativamente diferentes entre sí, arrojando valores de 25,53 (Dosis 1) y 25,92 (Dosis 2), respectivamente.

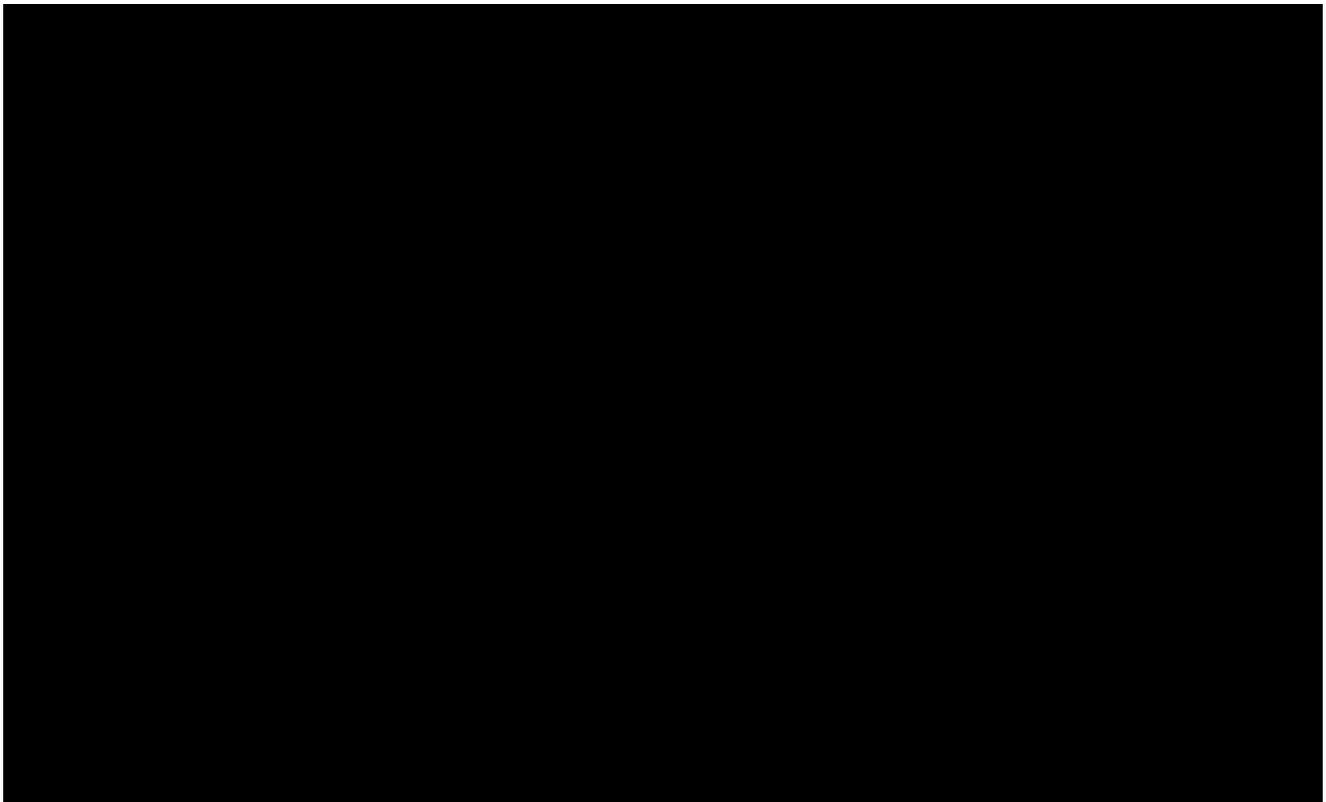


Figura 6. Viscosidad cinemática de las diluciones (Dosis 1 y 2) del formulado experimental y de su respectivo solvente de aplicación (agua). Cada valor representa la media de 5 réplicas independientes con su respectivo intervalo de confianza al 95%. Las diferentes letras sobre los puntos indican diferencias significativas entre las medias según la prueba de Tukey para $p < 0.05$.

2.b) Distribución del tamaño de las micelas poliméricas mediante dispersión de luz dinámica. A partir de la simple observación de las funciones de autocorrelación (Apéndice 3) se desprende que el formulado experimental diluido en agua (ambas dosis) presentó un carácter monomodal, a diferencia del carácter bimodal del formulado experimental sin diluir. Además del carácter monomodal de la

dispersión, la distribución de tamaño de su única población micelar fue casi idéntica en las diferentes condiciones de almacenamiento testeadas (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución del tamaño promedio de las micelas en el formulado experimental diluido en agua, para cada tiempo y temperatura de almacenamiento consideradas.

Muestra	Tipo de Distribución	Distribución de tamaño ¹ nm ± DS
24 hs D1	Monodispersa	30,40 ± (0,073)
24 hs D2	Monodispersa	30,79 ± (0,055)
3 Meses 5°C D1	Monodispersa	29,75 ± (0,047)
3 Meses 5°C D2	Monodispersa	33,70 ± (0,111)
3 Meses 25°C D1	Monodispersa	29,77 ± (0,020)
3 Meses 25°C D2	Monodispersa	32,98 ± (0,049)
6 Meses 5°C D1	Monodispersa	31,16 ± (0,047)
6 Meses 5°C D2	Monodispersa	31,67 ± (0,122)
6 Meses 25°C D1	Monodispersa	31,12 ± (0,151)
6 Meses 25°C D2	Monodispersa	31,62 ± (0,115)

Referencias: 1. Cada valor **nm ± DS**, representa el valor medio expresado en nanómetros de las medidas realizadas con su respectiva desviación estándar. Cada análisis fue realizado por triplicado.

3) Determinación indirecta de la retención de tebuconazol en la madera impregnada.

Inicialmente, para determinar la cantidad de tebuconazol disperso en las diferentes mezclas (mezcla inicial y mezclas recuperadas) se realizó una curva de calibración con 4 concentraciones (0 mg/ml, 1,045 mg/ml, 0,502 mg/ml y 0,128 mg/ml). A partir de la curva de regresión obtenida con un coeficiente de regresión de 99% se pudo estimar la concentración del tebuconazol en las muestras, conociendo el área bajo la curva de cada pico de acuerdo a la fórmula que se observa en la Figura 7.

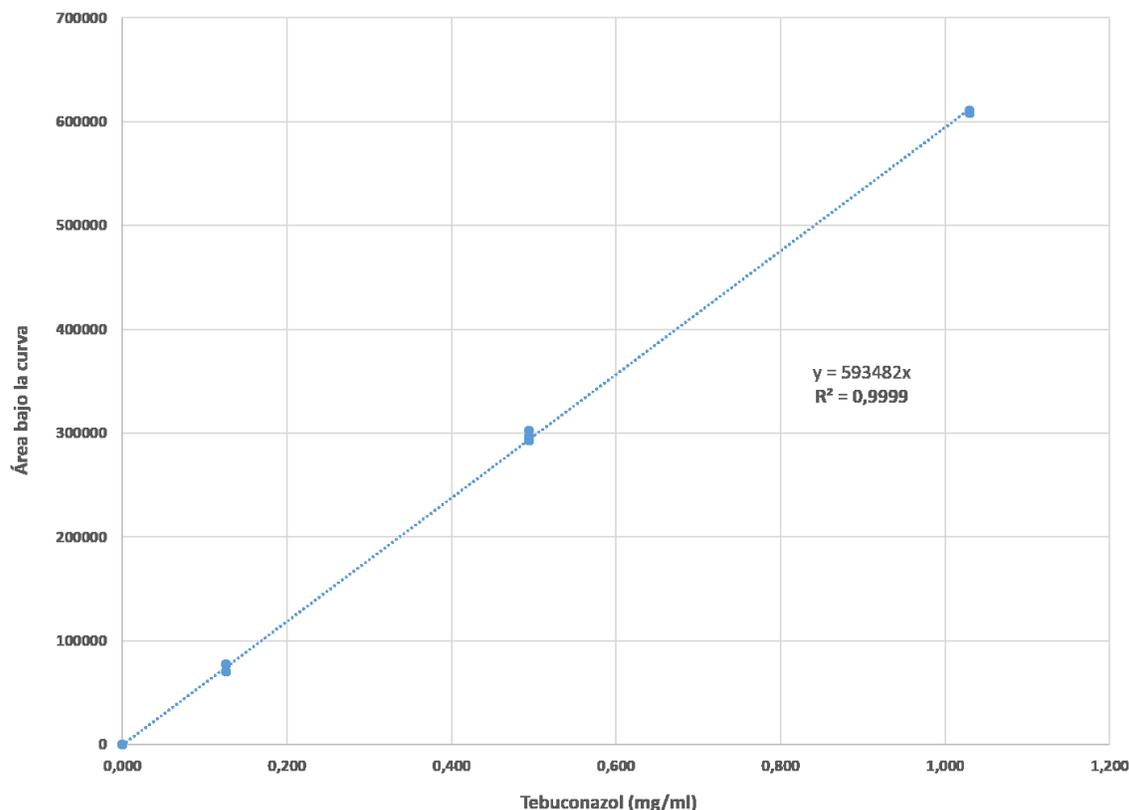


Figura 7. Recta de calibración para estimar la concentración de tebuconazol en las muestras obtenidas durante el proceso de impregnación.

Habiendo realizado la curva de calibración con la técnica de extracción y el solvente utilizado en las muestras, se procedió al estudio de retención indirecta del tebuconazol en las mismas. Considerando que se evaluaron dos dosis de aplicación, se procedió a analizar ambas dosis por separado.

- **Dosis 1 (50 ml de formulado experimental diluidos en 2000 ml de agua) (Figura 8).** Al diluir los 50 ml del formulado experimental en 2000 ml de agua, se logró una concentración teórica en la dilución inicial de 0,375 mg/ml. Los valores experimentales de concentración del tebuconazol determinados mediante GC-MS en esta dosis son coincidentes con los resultados teóricos anteriormente mencionados, arrojando un valor promedio de $0,395 \pm 0,02$ mg/ml, no diferenciándose significativamente de su valor teórico ($p_{\text{value}} < 0,05$), resultados que validan positivamente la técnica de extracción y cuantificación del tebuconazol disperso en la mezcla de impregnación.

El volumen inicial de la mezcla utilizada fue de 1800 ml para impregnar las probetas de madera que presentaron un peso total de 543,46 g. Durante el proceso de impregnación y luego de llevar el equipo de impregnación a 1 atm se recuperó un volumen parcial de 1100 ml y posteriormente, después del vacío final se recuperaron adicionalmente 105 ml. Estos datos mostraron que después del proceso de impregnación se recuperó un volumen total de 1205 ml, un 67% del volumen total que ingresó al equipo de impregnación. Considerando estos cálculos y por diferencia de volumen se estimó que la madera retuvo un total de 595 ml (1800-1205 ml).

Asimismo, la concentración de tebuconazol determinada por GC-MS para las dos mezclas recuperadas fue de $0,364 \pm 0,01$ mg/ml para la mezcla recuperada sin vacío final (1100 ml) y $0,254 \pm 0,02$ mg/ml para la mezcla obtenida al final del proceso de impregnación (105 ml con vacío final). Aplicando la fórmula correspondiente $(0,395 \cdot 1800 - 0,364 \cdot 1100 + 0,254 \cdot 105 / 595)$ se obtuvo una concentración de tebuconazol en la mezcla retenida por la madera de 0,477 mg/ml. A partir de los datos experimentales y sus cálculos respectivos se pudo estimar que los 543,46 g de madera retuvieron un total de 595 ml de una emulsión que contiene una concentración de tebuconazol en el orden de los 0,477 mg/ml, esto finalmente representa un valor de retención de tebuconazol por gramo de madera de 0,522 mg.

En resumen, la concentración de las dos mezclas recuperadas a lo largo del proceso de impregnación (con vacío y sin vacío final) disminuyó, ya que parte del activo quedó retenido en la madera. Considerando que ingresaron al autoclave un total de 50 ml de formulado (0,75 g de tebuconazol) para impregnar una muestra de 543,46 g, entonces se estimó que cada gramo de madera pudo retener como máximo un total de 1,308 mg de tebuconazol. En términos de eficiencia de retención química se pudo estimar que la madera retuvo 0,522 mg de tebuconazol por cada gramo de madera, de un total posible de 1,308 mg, lo que finalmente se traduce en un valor de retención cercano al 40%.

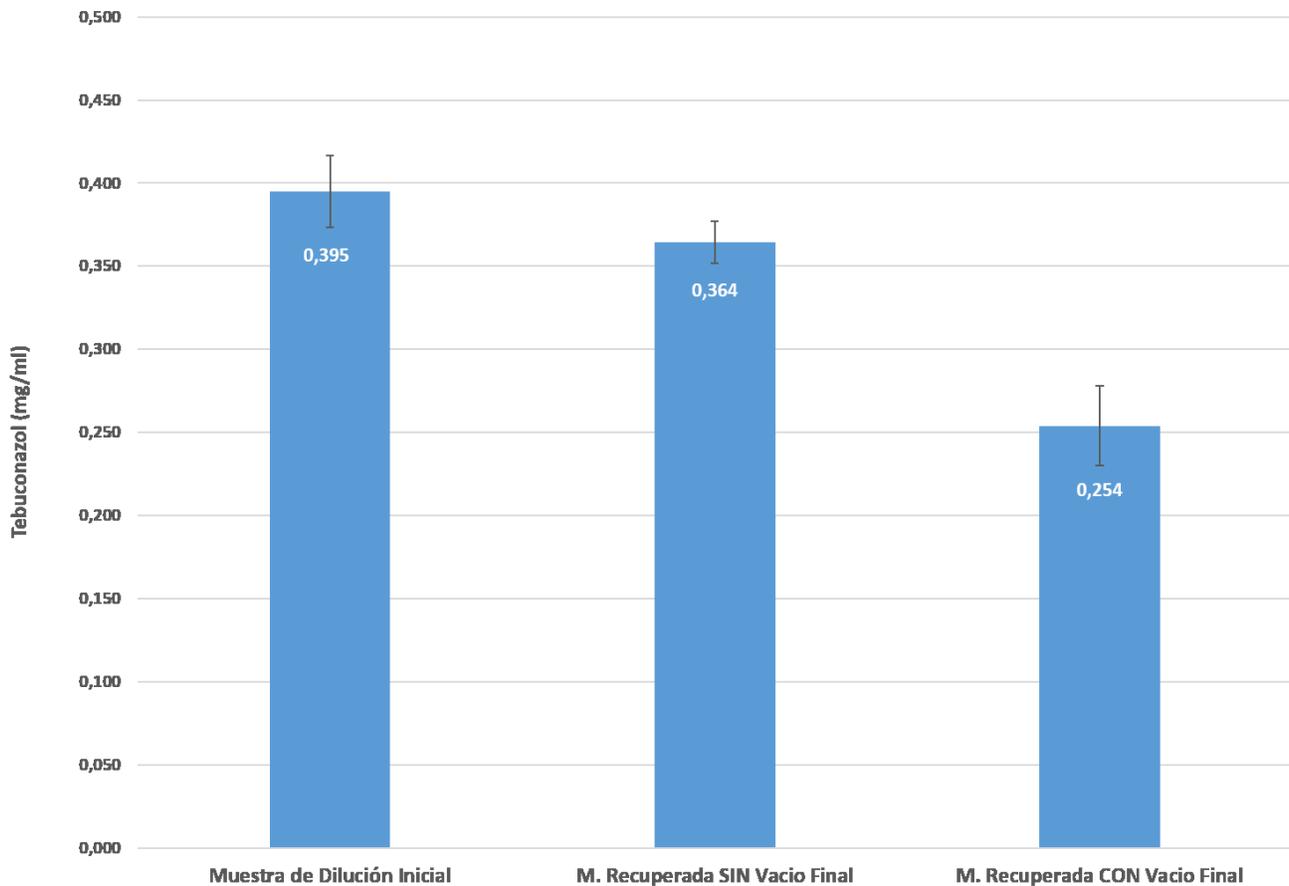


Figura 8. Concentración de tebuconazol (mg/ml) utilizando la dosis 1, determinada mediante GC-MS para diferentes etapas del proceso de impregnación. Cada valor representa la media de dos réplicas independientes con su respectiva desviación estándar.

- **Dosis 2 (100 ml de formulado experimental diluidos en 2000 ml de agua) (Figura 9).** Siguiendo la misma lógica utilizada en el apartado anterior se determinó que la concentración teórica en la dilución inicial del formulado (mezcla de impregnación) debería ser de 0,750 mg/ml. Los valores de concentración de tebuconazol determinados mediante GC-MS fueron coincidentes con los resultados teóricos, arrojando un valor promedio de $0,754 \pm 0,02$ mg/ml, no diferenciándose significativamente de su valor teórico ($p_{\text{value}} < 0,05$). El volumen inicial de la mezcla utilizada fue de 1800 ml para impregnar las probetas de madera con un peso total de 534,61 g. Luego de llevar el equipo de impregnación a 1 atm se recuperó un volumen parcial de 1050 ml y posteriormente, después del vacío final se recuperaron adicionalmente 105 ml. Estos datos demuestran que después del proceso de impregnación se ha recuperado un volumen total de 1155 ml, un 65% del total que ingresó al equipo

de impregnación. Considerando estos cálculos y por diferencia de volumen se determinó que la madera retuvo un total de 645 ml (1800-1155 ml). Asimismo, la concentración de tebuconazol determinada por GC-MS para las dos mezclas recuperadas fue de $0,706 \pm 0,03$ mg/ml para la mezcla recuperada sin vacío final (1050 ml) y $0,568 \pm 0,04$ mg/ml para la mezcla obtenida con vacío final, al final del proceso de impregnación (105 ml). Aplicando la fórmula correspondiente ($0,754 * 1800 - 0,706 * 1050 + 0,568 * 105 / 645$) se obtuvo que la concentración de tebuconazol en la mezcla retenida por la madera fue de 0,862 mg/ml. A partir de los datos teóricos calculados y experimentales obtenidos se pudo estimar entonces que los 534,61 g de madera retuvieron un total de 645 ml de una emulsión con una concentración de tebuconazol en el orden de los 0,862 mg/ml, esto finalmente representa un valor estimado de retención de tebuconazol por gramo de madera de 1,041 mg.

A partir de los resultados obtenidos se pudo observar, al igual que en caso anterior, que la concentración de las dos mezclas recuperadas a lo largo del proceso de impregnación (con vacío y sin vacío final) disminuyó con respecto a la original, debido a su retención en la madera. En términos de eficiencia de retención química se pudo estimar que la madera retuvo 1,041 mg de tebuconazol por gramo de madera, de un total posible de 2,538 mg, lo que finalmente se traduce en un valor de retención del 41%.

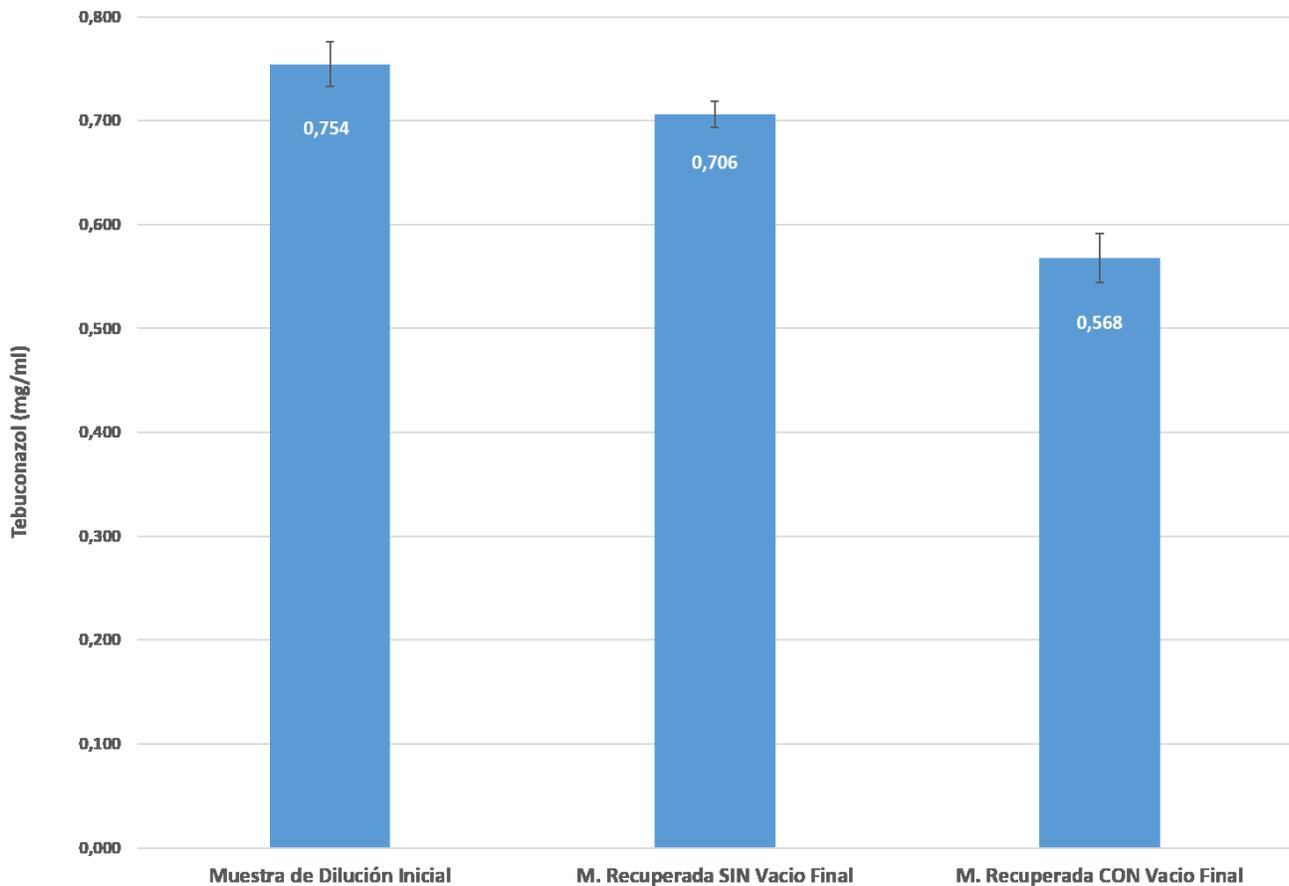


Figura 9. Concentración de tebuconazol (mg/ml) utilizando la dosis 2, determinada mediante GC-MS en los diferentes puntos del proceso de impregnación. Cada valor representa la media de dos réplicas independientes con su respectiva desviación estándar.

4) Estimación de la resistencia a la biodegradación

En las Figuras 10 y 11 se representa el porcentaje medio de pérdida de peso (Pp %) determinado en las probetas de la totalidad de los tratamientos (testigos y tratadas) expuestas a la acción de *Gloeophyllum sepiarium* y *Pycnoporus sanguineus*, responsables de pudrición castaña y blanca, respectivamente. De acuerdo a lo esperado, en la madera sin tratamiento (Álamo y Haya) fue determinada la mayor Pp (%), particularmente en el material afectado por pudrición blanca. En la madera tratada con ambas dosis, los porcentajes medios de Pp (%) no superaron el 1%.

En las Tablas 4 y 5 queda reflejada la resistencia a la degradación fúngica que imparten ambas dosis del formulado experimental. Respecto del testigo, la madera tratada aumentó su clase de durabilidad en dos categorías (de poco durable a muy durable).

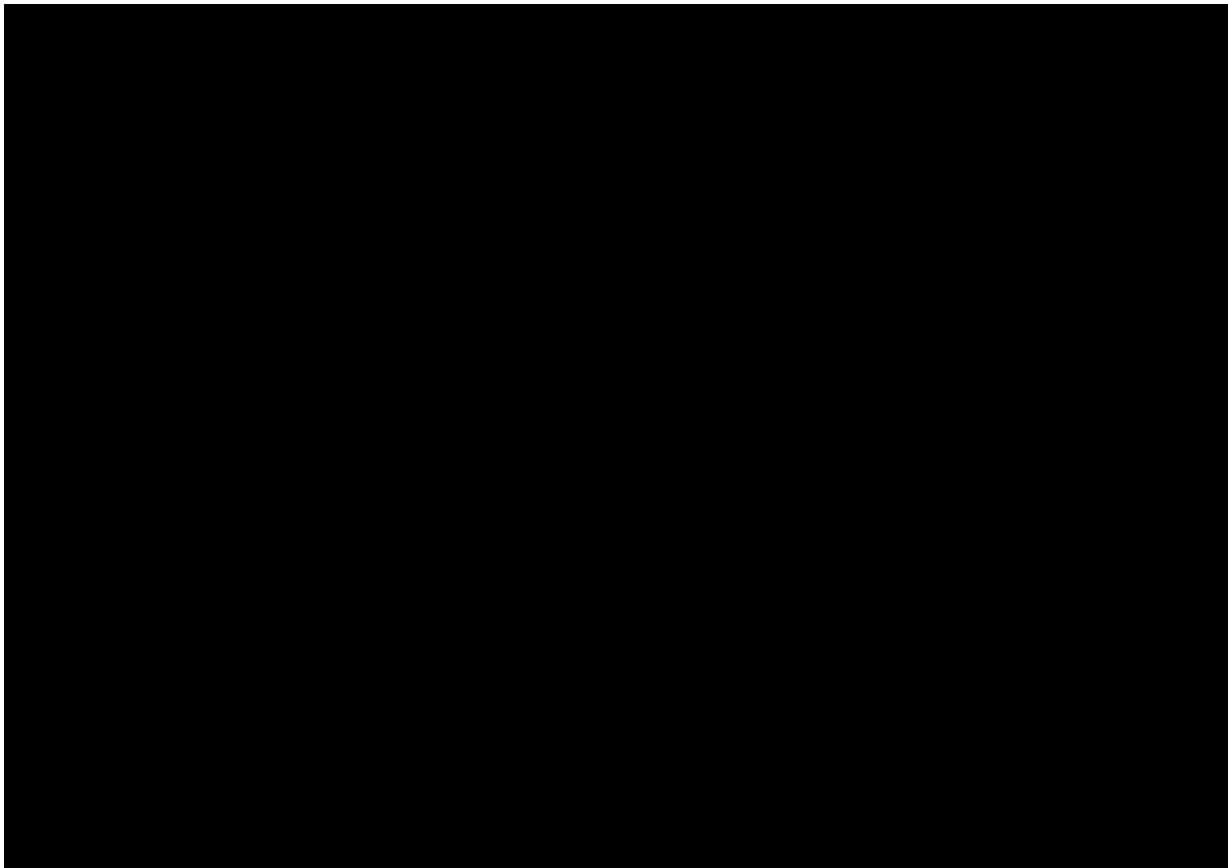


Figura 10. Pérdida de peso obtenida para las probetas de los diferentes tratamientos expuestas a pudrición castaña. Las diferentes letras sobre los puntos indican diferencias significativas entre las medias según la prueba de Tukey para $p < 0.05$.

Tabla 4. Clase de durabilidad de la madera expuesta a pudrición castaña

Tratamiento	Pérdida de Peso Media (%) ± (DS)	Valor X	Clase Durabilidad (UNE 350)
HAYA	25,75 (8,39)		
DOSIS 1 (50 ml/2000 ml)	1,66 (1,46)	0,064	1 (Muy durable)
DOSIS 2 (100 ml/2000 ml)	1,14 (0,71)	0,044	1 (Muy durable)
Testigo	21,71 (7,27)	0,843	3 (Poco durable)

DS: Desviación estándar

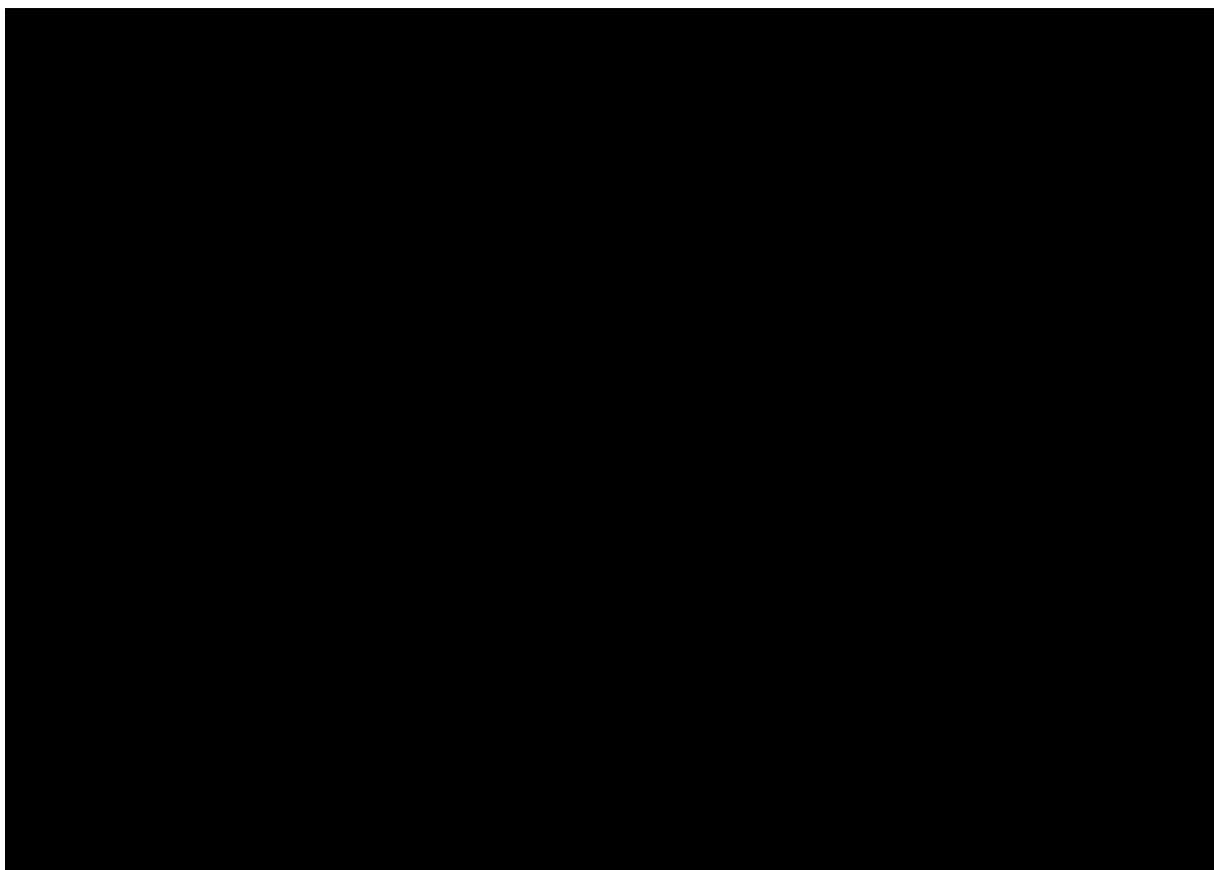


Figura 11. Pérdida de peso de las diferentes probetas ante la acción del hongo responsable de la pudrición blanca.

Tabla 5. Clase de durabilidad de la madera expuesta a pudrición blanca

Tratamiento	Pérdida de Peso Media (%) ± (DS)	Valor X	Clase Durabilidad (UNE 350)
HAYA	32,40 (13,0)		
DOSIS 1 (50 ml/2000 ml)	-1,66 (1,41)	0,051	1 (Muy durable)
DOSIS 2 (100 ml/2000 ml)	-2,10 (0,97)	0,064	1 (Muy durable)
Testigo	29,87 (16,03)	0,922	3 (No durable)

DS: Desviación estándar

DISCUSION

Durante el transcurso del trabajo de investigación se ha podido desarrollar el formulado experimental, determinar su densidad y tamaño de sus micelas a diferentes condiciones de almacenamiento y además, preparar las diluciones preservantes, determinar su viscosidad cinemática y evaluar su actividad biológica frente a hongos xilófagos.

El formulado experimental conteniendo 1,5 % p/v de tebuconazol. 4 % p/v de eugenol y 7.5 % p/v de Poloxamer 407 fue almacenado en diferentes condiciones de temperatura (5 y 25°C) a lo largo del tiempo (24 hs 3 y 6 meses). En cada muestra analizada (almacenada durante tiempos y temperaturas diferentes), la identificación mediante DLS de dos poblaciones de micelas podría asociarse con la dificultad para homogeneizar las emulsiones, debido principalmente a la alta viscosidad de las soluciones del polímero Poloxamer 407 en alta concentración. La similitud de las funciones de autocorrelación obtenidas para las distintas muestras evidencia que las emulsiones conteniendo tebuconazol encapsulado no presentan ningún cambio significativo en su estabilidad, ya que no resultaron en un proceso de desestabilización macroscópica del mismo. En general, las micelas conformadas por polímeros tribloque con actividad tensioactiva forman un núcleo hidrófobo, en el que los compuestos lipofílicos (Ej. tebuconazol) pueden incorporarse físicamente. Los segmentos hidrofílicos de los polímeros generan la corona hidrofílica y encapsulan el núcleo hidrofóbico (Kim y Park, 2010). En este estudio, la solubilización del tebuconazol en el núcleo hidrofóbico conformado por el eugenol aumentó el volumen de la fase orgánica de la micela, por lo que la cubierta hidrofílica del copolímero se acomoda especialmente en un mayor volumen permitiendo que el compuesto activo solubilizado permanezca en el núcleo.

En los procesos de encapsulación con copolímeros tribloque las micelas cargadas con drogas hidrofóbicas pueden oscilar entre los 10 y 200 nm y pueden dispersarse con éxito en medios acuosos (Kim y Park, 2010). De acuerdo con Batrakova et al. (2006) existen tres métodos principales para encapsular drogas lipofílicas en núcleos de micelas poliméricas: (1) conjugación química, (2) atrapamiento físico o solubilización, y (3) complejación poliónica (p. Ej., unión iónica). La

encapsulación del tebuconazol se debe a que la dispersión del mismo en agua requiere de un entorno hidrófobo y las soluciones micelares del copolímero pueden proporcionar dicho entorno. Sin embargo, la mayor hidrofobicidad del tebuconazol y su escasa solubilidad en agua dificulta su dispersión directa en soluciones micelares acuosas de Poloxamer 407 (Hodgdon y Kaler, 2007; Pesticide Properties Data Base (PPDB), 2017). En este marco, la adición de una pequeña cantidad de eugenol facilita la dispersión del tebuconazol en el agua. Este resultado coincide con los estudios previos de (Simamora et al 2001; Booth y et al., 2012; Lucia et al., 2018). Estos últimos descubrieron que los solutos aromáticos, como el eugenol o estructuras similares, pueden actuar como un agente solubilizante de un segundo compuesto lipofílico, como ocurre en este estudio con el tebuconazol. Por lo tanto, es posible suponer que la dispersión del tebuconazol en el agua se ve facilitada debido a la adición del eugenol (Nidhi et al., 2011). Los estudios previos realizados también demuestran que existe una dependencia de la eficiencia de encapsulación del tebuconazol en relación a la concentración de eugenol; es decir, existiría una cantidad mínima de eugenol suficiente para aumentar significativamente la encapsulación del tebuconazol (Lucia et al., 2018).

A pesar de haber cambios en el tamaño y proporción de las micelas a lo largo del tiempo, a diferentes temperaturas, estos cambios no se tradujeron en una desestabilización del formulado ocasionando cambios irreversibles en la emulsión total de la columna. Esto último se sustenta en que el formulado experimental cambió su carácter binomial (con dos poblaciones de micelas bien definidas) a monomodal cuando fue diluido para su aplicación a las dosis evaluadas, con un tamaño promedio de micelas de 30 nm. El tamaño nanométrico de las micelas permitió una distribución homogénea en la mezcla impregnante, lo que fue corroborado con los resultados obtenidos en la determinación indirecta de tebuconazol en la dispersión impregnante mediante GC-MS, donde la concentración de tebuconazol teórica y la concentración experimental en la mezcla inicial de impregnación fueron iguales en las dos dosis evaluadas. Estos datos indican que las micelas conteniendo tebuconazol no sólo se distribuyeron de manera homogénea en toda la mezcla impregnante, sino que lo hicieron con un tamaño cercano a los 30 nm.

Por otro lado, la mayor densidad del formulado respecto del agua se corresponde, posiblemente, con la presencia de los componentes de mayor densidad que reemplazaron al agua en la formulación; eugenol ($1,06 \text{ g/cm}^3$), tebuconazol ($1,25 \text{ g/cm}^3$), Poloxamer 407 ($1,06 \text{ g/cm}^3$) y Agua ($0,998 \text{ g/ml}$).

Respecto de los resultados de la viscosidad cinemática de la mezcla de impregnación (menor que el agua), resulta favorable, ya que facilitaría la penetración del preservante en la madera. En general, la viscosidad es una de las propiedades más importantes de las soluciones poliméricas y depende de la estructura química del polímero, de las interacciones con el disolvente y del peso molecular (Tearoka, 2002). Normalmente, una molécula de alto peso molecular en un buen disolvente adquiere un gran volumen hidrodinámico y la viscosidad de la solución aumenta. Sin embargo, la viscosidad de sistemas dispersos coloidales, como las nanoemulsiones, depende de otros factores. En el presente estudio se observó una fase continua (agua) y una fase dispersa (micelas conteniendo el tebuconazol), por lo que la viscosidad depende de la interacción y tamaño de las gotas dispersas, de la fracción de volumen de la fase continua, junto con varios efectos menores, como la velocidad de corte, el tamaño promedio de la gota, la distribución del tamaño de la gota, la viscosidad y la densidad de los compuestos utilizados en la fase dispersa (Farah et al., 2005).

La distribución homogénea del tebuconazol en pequeñas micelas de 30 nm, manteniendo una baja viscosidad cinemática permitió que el tebuconazol se encuentre retenido en la madera luego del proceso de impregnación con una eficiencia cercana al 40 %, para las dos dosis evaluadas.

Asimismo, se determinó que no hubo una saturación física de la madera en el rango de las concentraciones evaluadas, ya que al trabajar al doble de la concentración en la mezcla impregnante la retención en la madera también fue duplicada. Esto último puede explicarse mediante la correlación lineal existente entre la concentración de tebuconazol disperso en la mezcla de impregnación y la cantidad de tebuconazol retenido en la madera. Cuando la dosis de impregnación es incrementada al doble, la cantidad de tebuconazol retenida en la madera también se incrementa en ese orden.

La presencia del tebuconazol en la madera, la efectividad de la formulación creada y de las dosis aplicadas, se reflejaron en los bioensayos de degradación fúngica, a partir de la elevada durabilidad adquirida por el material (Clase Durabilidad 1). La resistencia al deterioro determinada en las probetas de álamo suma evidencias respecto de la eficacia de los triazoles como preservantes de madera (Lebow, 2010). Por su tendencia a biodegradarse, el tratamiento de la madera con estos funguicidas permite la reutilización de la pieza tratada, facilitando finalmente su reubicación o disposición final una vez finalizada su vida útil en servicio (Kukowski et al., 2016). La durabilidad adquirida estimada además resultó similar a lo obtenido para madera de *Populus nigra* tratada con CCA mediante vacío-presión, preservante que, si bien es conocido por su alta efectividad, en los últimos más de 20 años es cuestionado mundialmente por su toxicidad y por ello con uso restringido (Díaz et al., 2003).

El presente estudio ha demostrado que es posible preparar plataformas de tipo coloidal para encapsular y liberar de manera eficiente principios activos. Como ejemplo concreto se ha discutido en detalle el caso de las emulsiones de eugenol en agua estabilizadas por el polímero Poloxamer 407 como plataforma para la encapsulación de un funguicida pobremente soluble en agua como lo es el tebuconazol.

CONCLUSIONES

La formulación desarrollada demuestra que es posible vehiculizar y dispersar en agua un principio activo lipofílico como el tebuconazol en pequeñas micelas poliméricas, constituyendo en su conjunto una emulsión aceite en agua (o/w) de tamaño nanométrico. Esta plataforma (poloxamer-eugenol) para dispersar moléculas bioactivas poco solubles en agua (Ej. tebuconazol) presenta una gran potencialidad para el desarrollo de productos en el ámbito de la industria farmacológica, terapéutica, industrial, agropecuaria y veterinaria. La técnica mencionada permite desarrollar productos con un elevado contenido de agua, reemplazando los tensioactivos convencionales para dispersar las moléculas bioactivas en agua y los solventes orgánicos comúnmente utilizados para disolver la molécula poco soluble en agua. Por este motivo, al tratarse de una formulación acuosa de muy bajo impacto ambiental podría tener lugar comercialmente en lo que se denomina "línea jardín", es decir aquellos productos de venta libre que deberían ser más seguros desde el punto de vista toxicológico y con un perfil ambiental más favorable.

Además de lo expuesto en el desarrollo de esta tesis, a continuación se enuncian una serie de ventajas que presenta dicho formulado frente a los ya existentes, basados en sus características novedosas;

- El transporte y almacenamiento de dicho formulado debería presentar menos riesgo toxicológico cuando es comparado con las formulaciones utilizadas hoy en día, debido principalmente a la ausencia de solventes orgánicos y tensioactivos convencionales.
- El formulado de carácter acuoso debería disminuir la toxicidad y finalmente el riesgo de intoxicación de los agentes manipuladores del producto.
- Comparado con las demás formulaciones utilizadas para este uso específico, reduciría el riesgo de incendio en las instalaciones durante el proceso de formulación y finalmente, reduciría el impacto negativo en el medio ambiente.

- La simplicidad de la metodología utilizada para la encapsulación, en la que solo se requiere agitación suave y temperatura, es una ventaja adicional para el desarrollo de formulaciones para la aplicación, ya que no es necesario el uso de dispositivos complejos para su preparación, como por ejemplo homogeneizadores de alta presión. Esto facilita la preparación in situ de la formulación cuando sea requerido, reduciendo los costos asociados con la preparación y transporte.

Las dosis resultantes de la dilución del formulado experimental en agua incrementan notablemente la durabilidad o resistencia a la degradación fúngica de la madera. Ambas dosis aumentaron la durabilidad de la madera en igual medida siendo preferible la dosis 1 al utilizar una dilución más alta. De acuerdo con ello, puede considerarse que el tebuconazol encapsulado en micelas poliméricas podría ser una alternativa al uso del cuestionado CCA como así también al uso de preservantes oleosolubles, y de este modo minimizar el impacto ambiental. Por lo tanto, los resultados presentados aquí combinados con estudios adicionales de estas formulaciones podrían abrir varias posibilidades para la preparación de formulaciones listas para usar con elevada estabilidad para la dispersión en agua de una tercera molécula bioactiva (Ej. insecticida).

BIBLIOGRAFÍA

- **Alexandridis, P., Zhou, D.L & Khan, A.** 1996. Lyotropic liquid crystallinity in amphiphilic block copolymers: temperature effects on phase behavior and structure for poly(ethylene oxide)-b-poly(propylene oxide)-b-poly(ethylene oxide) copolymers of different composition. *Langmuir*. 12: 2690-2700.
- **Barradas, T.N., Lopes, L.M., Ricci-Júnior, E., de Holanda, E., Silva, K, G & Mansur, C.R.** 2013. Development and characterization of micellar systems for application as insect repellents. *Int J Pharm*. 1, 454:633-640.
- **Batrakova, E.V., Bronich, T.K., Vetro, J.A & Kabanov, A.V.** 2006. Polymer micelles as drug carriers. en: Torchilin, V.P. (Ed.), *Nanoparticulates as Drug Carriers*. Imperial College Press, London, pp. 57-93.
- **Booth, J.J., Abbott, S., Shimizu, S.** 2012. Mechanism of Hydrophobic Drug Solubilization by Small Molecule Hydrotropes, *J. Phys. Chem. B*, 116, 14915-14921.
- **Buschhaus, H.U., Valcke, A.R.,** 1995. Triazoles: Synergism between Propiconazole and Tebuconazole. IRG/WP 95-30092. International Research Group on Wood Preservation, Stockholm, p. 1.
- **Cabras, P., Angioni, A., Garau, V.L., Melis, M., Pirisi, F.M., Minelli, E.V., Cabitza, F., Cubeddu, M.** 1997. Fate of some new fungicides (cyprodinil, fludioxonil, pyrimethanil, and tebuconazole) from vine to wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2708e2710.
- **Chang, ST., Hon, D., Feist, W.** 1982. Photodegradation and photoprotection of wood. *Wood and Fiber* 14(2), pp. 104-1 17. The Society of Wood Science and Technology. 14 p.
- **Cole, M.L & Whateley, T.L.** 1997. Release rate profiles of theophylline and insulin from stable multiple W/O/W emulsions. *Journal of Controlled Release*, 49(1), 51e58.
- **Dalgleish, D.G.** 2004. Food emulsions: their structures and properties. En: Friberg SE, Larsson K, Sjöblom J. *Food Emulsions*. 4th Edition. New York: Marcel Dekker. pp: 1-44.
- **Directive 98/8/EC.** 2007. Concerning the placing of biocidal products on the market Inclusion of active substances. En Annex I to Directive 98/8/EC Assessment Report. Tebuconazole Product-type PT 8 Wood Preservative.
- **Eaton, R.A & Hale, M.D.C.** 1993. *Wood: Decay, Pests and Protection*. Chapman and Hall, London.

- **EN 350.** 2016. Durability of wood and wood-based products - Testing and classification of the durability to biological agents of wood and wood-based materials. European Committee for Standardization, Bruxelles, 32 pp.
- **Farah, M.A., Oliveira, R.C., Caldas, J.N & Rajagopal, K.** 2005. Viscosity of water-in-oil emulsions: Variation with temperature and water volume fraction. *Journal of Petroleum Science and Engineering*. Volume 48, Issues 3-4, 169-184.
- **Fishel, F.M.** 2010. Pesticide Formulations. Agronomy Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Document PI231. Website at <https://edis.ifas.ufl.edu/pi231>. Visitado Agosto 2019.
- **Fishel, F.M.** 2011. What are inert ingredients? PI-44. Gainesville: University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences. <http://edis.ifas.ufl.edu/pi081>. Visitado Agosto 2019.
- **Highley, T.L.** 1987. Biochemical aspects of white rot and brown rot decay. The International Research Group on Wood Preservation. Document N°: IRG/WP/1319. 22 pp.
- **Hino, T., Yamamoto, A., Shimabayashi, S., Tanaka, M & Tsujii, D.** 2000. Drug release from W/O/W emulsions prepared with different chitosan salts and concomitant creaming up. *Journal of Controlled Release*, 69(3), 413e419.
- **Hodgdon, T.K & Kaler, E.W.** 2007. Hydrotropic solutions, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* , 12, 121-128.
- **Ivanova, R., Lindman, B & Alexandridis, P.** 2000. Evolution in structural polymorphism of pluronic F127 poly (ethylene oxide)–poly (propylene oxide) block copolymer in ternary systems with water and pharmaceutically acceptable organic solvents: from glycols to oils. *Langmuir*. 23,9058-9069.
- **Joseph-Horne, T., Hollomon, D., Loeffler, R.S.T & Kelly, S.L.,** 1995. Altered P450 activity associated with direct selection for fungal azole resistance. *Federation of European Biochemical Societies* 374, 174e178.
- **Kim, S. & Park, K.** 2010. Polymer micelles for drug delivery. In: Narang AS, Mahato RI, eds. *Targeted delivery of small and macromolecular drugs*. Boca Raton: CRC Press. 513-551.
- **Kukowski, K., Martinská, V., Krishnamoorthy, G., Kubátová, A & Kozliak, E.** 2016. Diffusion of tebuconazole into softwood under ambient conditions and its distribution in freshly treated and aged wood. *International Journal of Heat and Mass Transfer* 102, 1257–1266
- **Laugel, C., Baillet, A., Youenang Piemi, M.P., Marty, J.P & Ferrier, D.** 1998. Oil- water-oil multiple emulsions for prolonged delivery of hydrocortisone after topical application: comparison with simple emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 160(1), 109e117.

- **Lebow, S.T.** 2010. Wood preservation. Wood handbook: wood as an engineering material: chapter 15. Centennial ed. General technical report FPL; GTR-190. Madison, WI: U.S. Dept. of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory. p. 15.1-15.28.
- **Loughman, R & Thomas, G.J.** 1992. Fungicide and cultivar control of *Septoria* diseases of wheat. Crop Protection 11, 349e354.
- **Lucia, A., Toloza, A. C.; Guzmán, E.; Ortega, F & Rubio, R.G.** 2017. Novel polymeric micelles for insect pest control: encapsulation of essential oil monoterpenes inside a triblock copolymer shell for head lice control. PeerJ 5: e3171 <https://doi.org/10.7717/peerj.3171>
- **Lucia.,** 2018 P. Patente de invención: Nuevo procedimiento para la fabricación de sistemas de liberación de insecticidas basados en plataformas nanométricas para el control de insectos: el caso del piriproxifen para el control de larvas de *aedes aegypti*. analisis de patentabilidad – envío del formulario de divulgación de invención (fdi) a la dirección de vinculación tecnológica (dvt-conicet). Fecha de envío y estado actual: 26 de enero de 2018, Buenos Aires. código identificador: 282.
- **McClements, D.J.** 2005. Context and background. En: Food emulsions, principles, practices and techniques, second edition. New York: CRC Press. pp1-26.
- **McClements, D.J.** 2015. Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. Advances in coloidal and interface science. 219, 27-53.
- **Nidhi, K., Indrajeet, S., Khushboo, M., Gauri, K., Sen, D.J.,** 2011. Hydrotropy: A promising tool for solubility enhancement: A review, Int. J. Drug Dev. Res., 3, 26-33.
- **Reinprecht, L.** 2010. Fungicides for Wood Protection - World Viewpoint and Evaluation/Testing in Slovakia, Fungicides, Odile Carisse (Ed.), InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/fungicides/fungicides-for-wood-protection-world-viewpoint-and-evaluation-testing-in-slovakia>.
- **Schmidt, O.** 2006. Wood and tree decay. Biology, Damage, Protection and Use. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 329 pp.
- **Sharma, P.K., Reilly, M.J., Bhatia, S.K., Sakhitab, N., Archambault, J.D & Bhatia, S.R.** 2008. Effect of pharmaceuticals on thermoreversible gelation of PEO–PPO–PEO copolymers. Colloid Surf. B. 63, 229-235.
- **Simamora, P., Alvarez, J.M., Yalkowsky, S.H.** 2001. Solubilization of rapamycin, Int J Pharm, 1, 25-29.

- **Tedajo G.M., Bouttier, S., Fourniat, J., Grossiord, J-L., Marty, J.P & Seiller, M.** 2005. Release of antiseptics from the aqueous compartments of a W/O/W multiple emulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, 288(1), 63e72.
- **Teraoka, I.** 2002. *Polymer solutions: an introduction to physical properties*. Wiley, New York
- **Woo, C., Daniels, B., Stirling, R & Morris, P.** 2010. Tebuconazol and propiconazole tolerance and possible degradation by Basidiomycetes: A wood-based bioassay. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(5), 403–408. doi:10.1016/j.ibiod.2010.01.009.
- **Zabel, R.A & Morrell, J.J.** 1992. *Wood microbiology. Decay and its prevention*. Academic Press Inc. 476 pp.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece con especial interés a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales por la Beca otorgada para llevar a cabo este trabajo final en el marco del Programa de Participación Estudiantil. Tareas de Investigación y Desarrollo. Res N° 571/16. Título del proyecto aprobado: "Evaluación de la efectividad del tebuconazole contra la acción de hongos xilófagos". Los directores agradecen al Lic. Ricardo Camera, de la Empresa Química Bosques S.A., por facilitar la planta piloto donde se realizaron los ensayos de impregnación. Por otro lado, un agradecimiento especial al Ing. Ftal M. Sc. Gabriel D. Keil, director del Proyecto Marco del tema propuesto: "Tecnologías aplicadas en madera de álamos (*Populus spp*) implantados en sistemas silvopastoriles de Río Negro y Neuquén". Código 11 A 291. Programa de Incentivos del Ministerio de Educación de La Nación. 2016-2018. Becario: Gastón Sartor (Legajo N° 26752/7).

APÉNDICE 1

IMPREGNACIÓN: PROCEDIMIENTO

La impregnación de la madera (listones de 20 mm x 160 mm) fue realizada en autoclave, mediante vacío-presión (método Bethell o célula llena) (**Figura 1, Andía y Keil, 2004; Figura 2**). Con este método se procura inyectar la mayor cantidad de preservante; lograr una alta concentración en la zona tratada. Además, este método permite regular parámetros como la penetración y retención del preservante y, de este modo, adecuarlos a la situación de uso a la que estará expuesta la madera. La secuencia de trabajo del tratamiento preservante fue la siguiente:

- 1.- Colocación de las probetas de madera en contenedor plástico.
- 2.- Inundación del contenedor con una dilución en agua del formulado experimental (impregnante).
- 3.- Colocación del contenedor en autoclave.
- 4.- Aplicación de vacío inicial de 650 mmHg durante 10 minutos (permite extraer el aire del autoclave y de los lúmenes celulares de la madera y, consecuentemente, el ingreso del impregnante).
- 5.- Aplicación de una presión de 3 kg/cm² durante 15 minutos.
- 6.- Reducción de la presión hasta 1 atm. y drenado del extracto (impregnante) sobrante.
- 7.- Realización de vacío final de 650 mmHg durante 2 minutos.
- 8.- Drenaje del líquido remanente y preparación del material para la instalación de los ensayos de toxicidad. Según se indicó se trabajó con 2 dosis de impregnación: **a.-** 50 ml del formulado en 2000 ml de agua y **b.-** 100 ml del formulado en 2000 ml de agua.

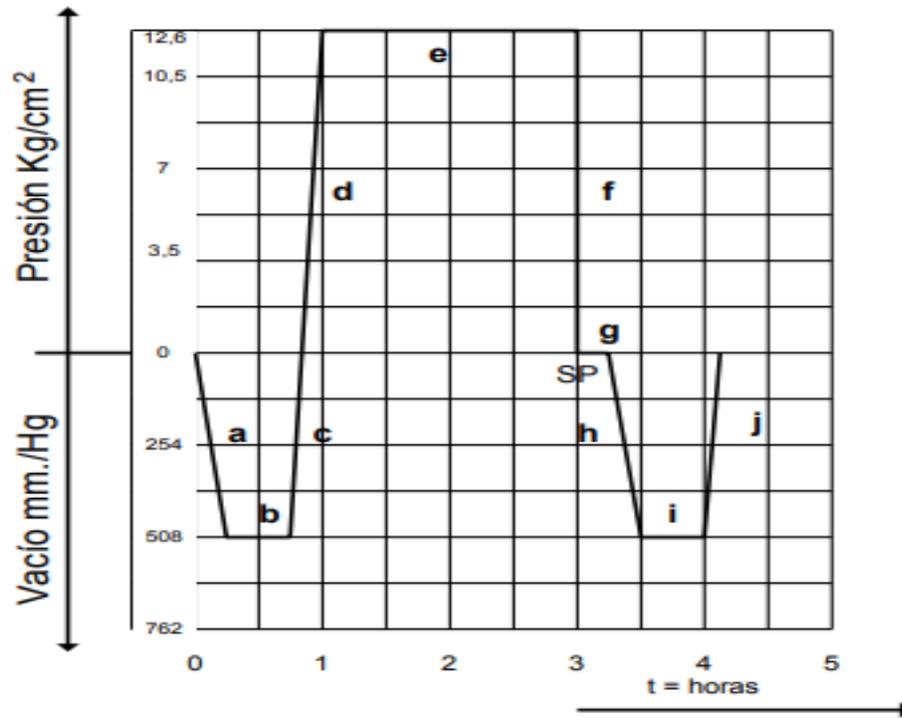


Figura 1: Método Bethell o célula llena



Figura 2: Arriba: Probetas de madera en contenedor, sumergidas en el preservante, dentro del autoclave. Abajo: Autoclave, vista general; manómetros que indican la presión utilizada en el proceso de impregnación.

Culminada la impregnación de la madera, los listones fueron colocados en estufa a 30 °C de temperatura y contenido de humedad del 60 % hasta comprobar peso constante (diferencia entre pesadas ≤ 0.02 g) (**Figuras 3a y 3b**). Logrado el peso constante, las piezas fueron cortadas bajo la forma de probetas de 20 mm de lado, pulidas en lijadora de banda, identificadas y nuevamente incorporadas en la estufa (**Figura 3c**), junto con el material considerado testigo (álamo sin tratar y madera de haya) hasta su utilización en los ensayos previstos.

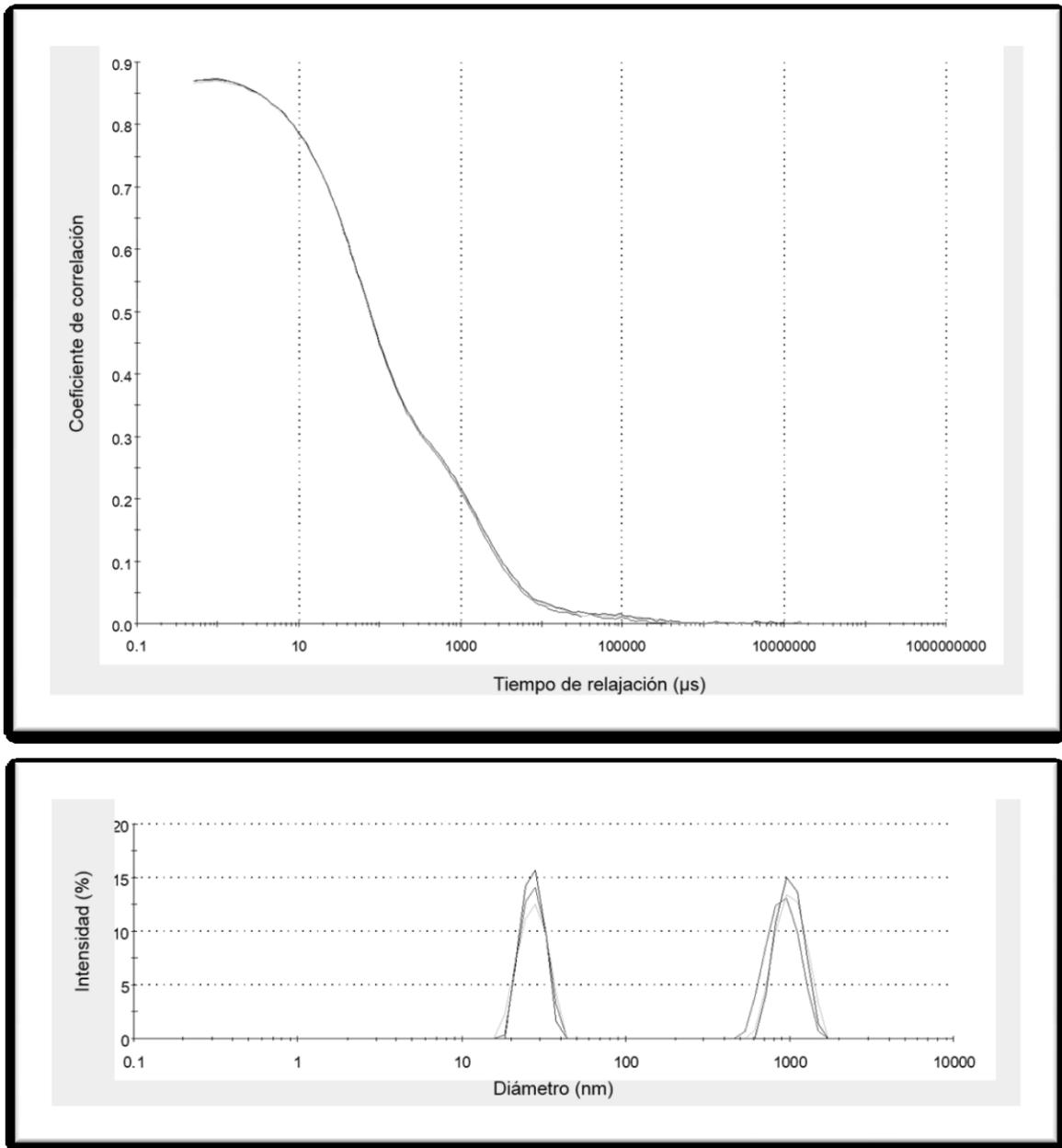


Figura 3: a) Pesado de la madera recién impregnada. b) Secado en estufa y c) Corte del listón grande impregnado en probetas de 20 mm de lado

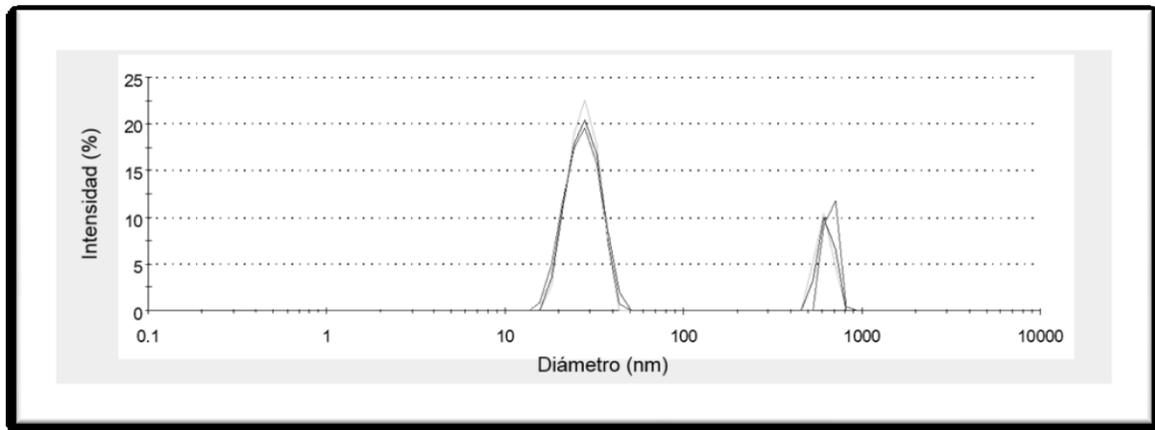
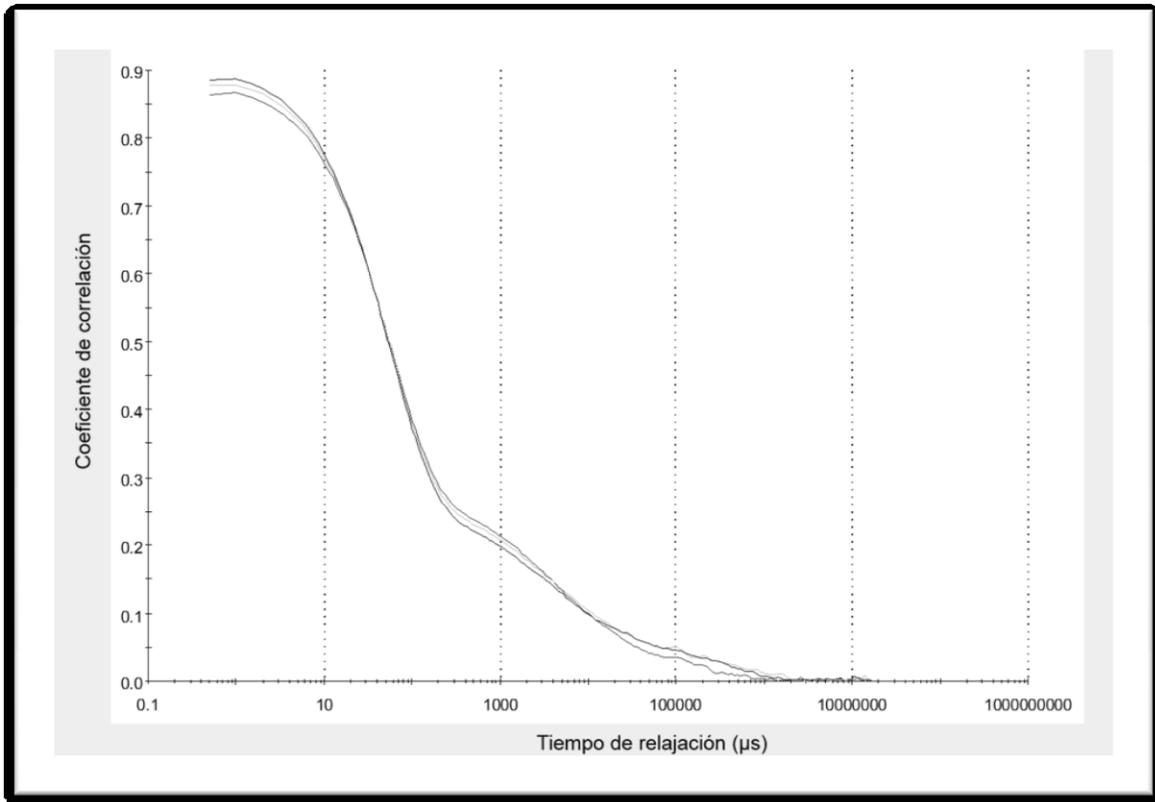
Bibliografía

- Andía, I. & G. Keil. 2004. Procesos y Equipos. Curso de actualización para Graduados: Biodegradación y Preservación de la Madera. Asentamiento Universitario San Martín de los Andes. Universidad Nacional de Comahue.

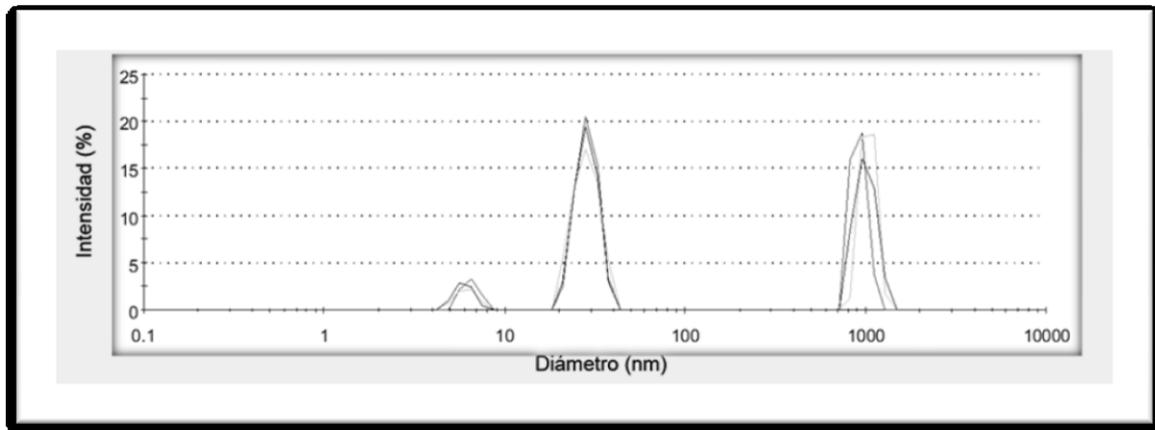
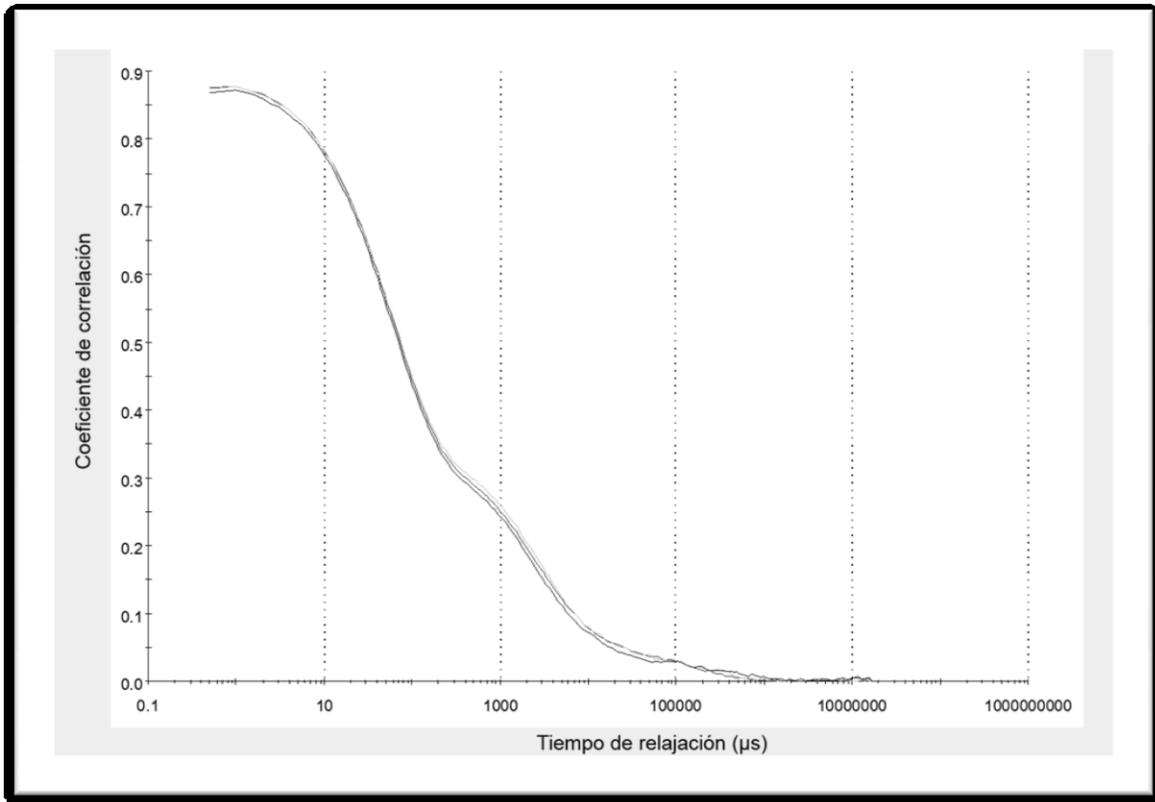
APÉNDICE 2



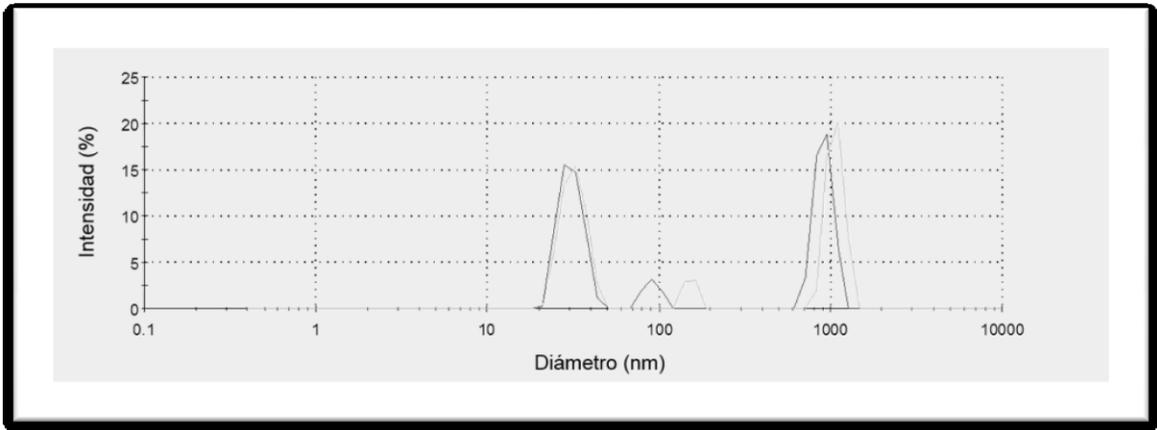
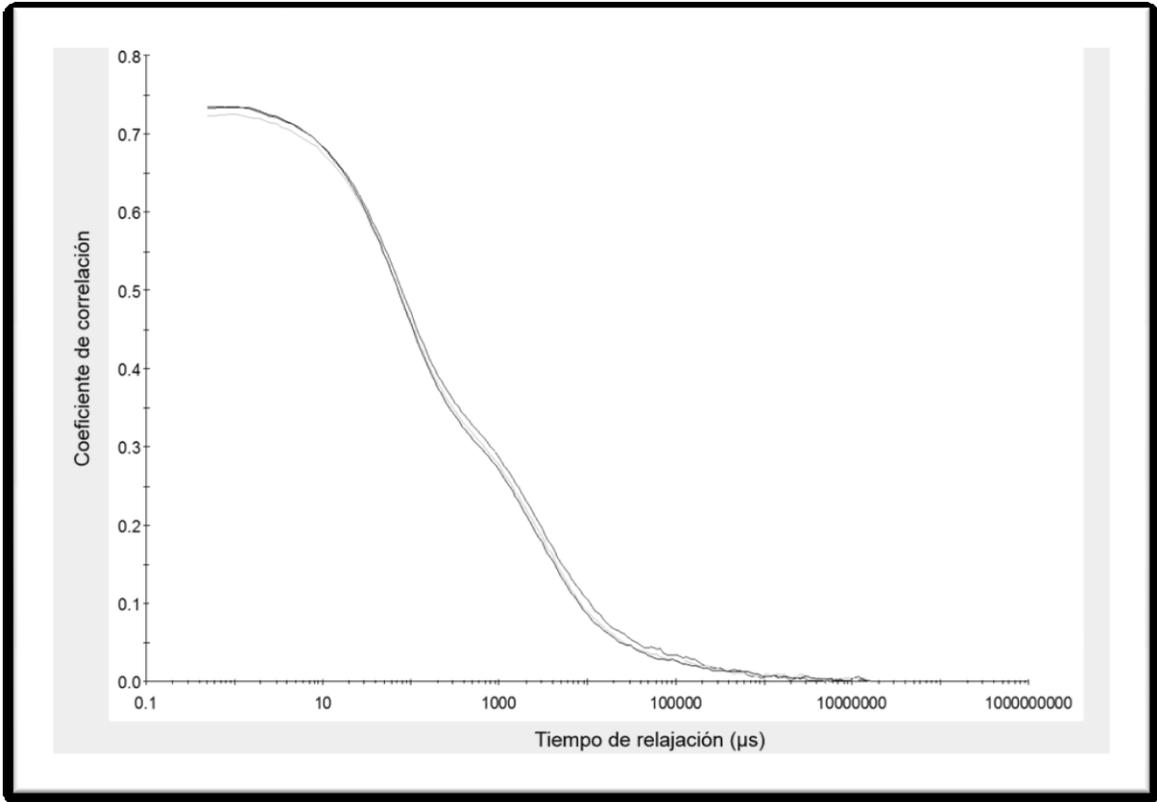
Funciones de autocorrelación (**Arriba**) y sus correspondientes distribuciones de tamaño representativas de las micelas (**Abajo**) del formulado experimental conteniendo una concentración de 1.5 % p/v de tebuconazol, 4 % p/v de eugenol y 7.5 % p/v de Poloxamer 407. Las muestras hacen referencia al formulado experimental después de 24 hs de envejecimiento a temperatura ambiente.



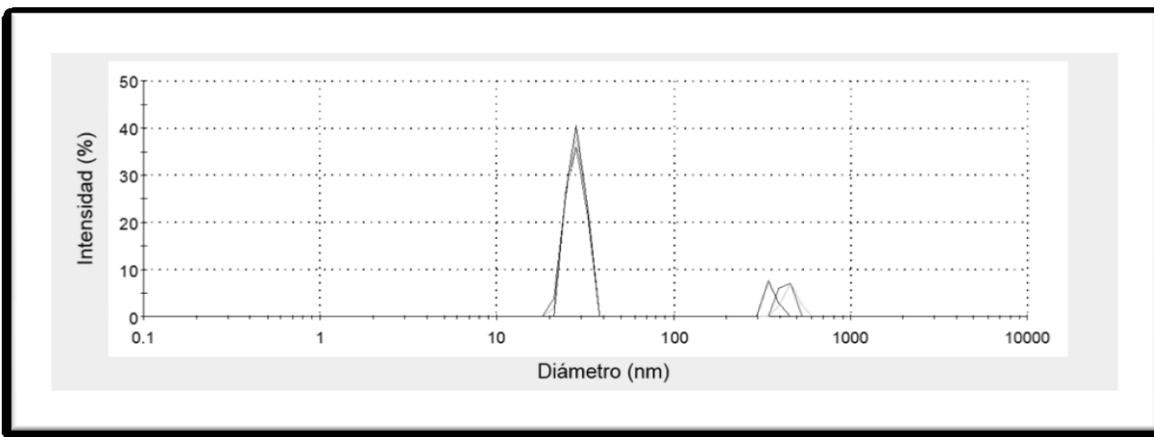
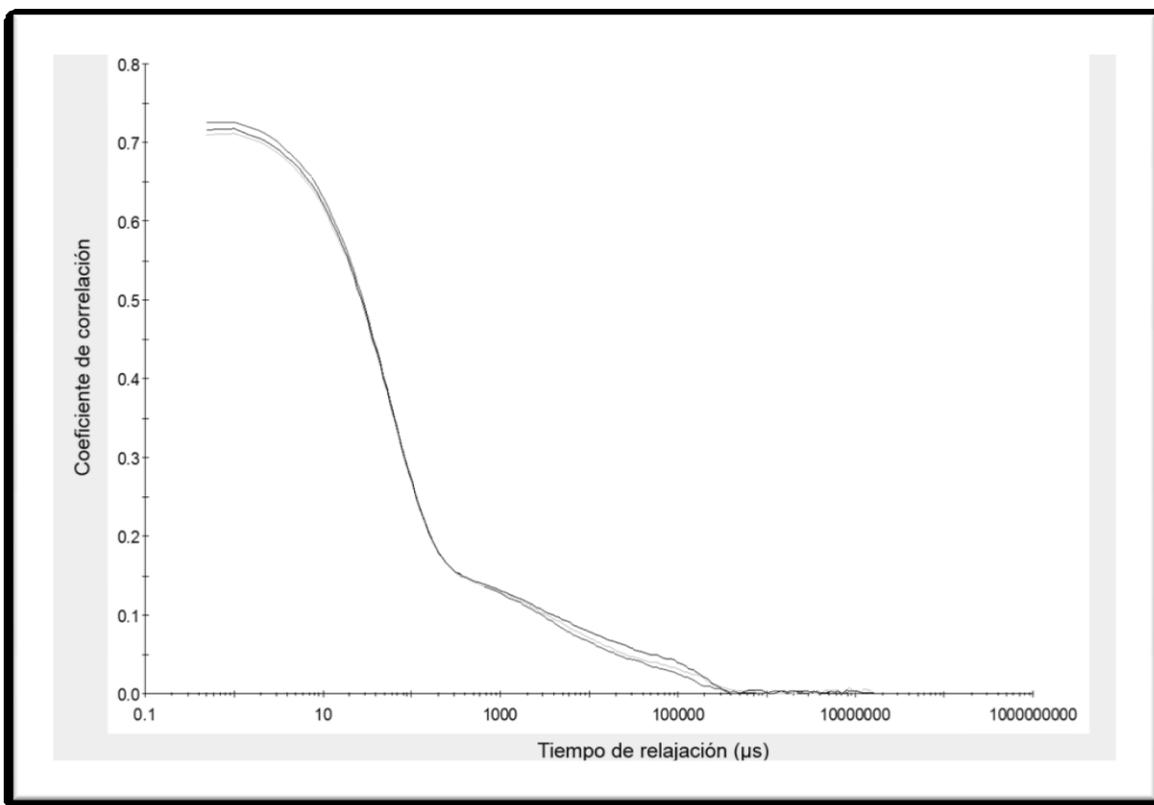
Funciones de autocorrelación (**Arriba**) y sus correspondientes distribuciones de tamaño representativas de las micelas (**Abajo**) del formulado experimental conteniendo una concentración de 1.5 % p/v de tebuconazol, 4 % p/v de eugenol y 7.5 % p/v de Poloxamer 407. Las muestras hacen referencia al formulado experimental después de 3 meses de envejecimiento almacenadas a una temperatura de 5 °C.



Funciones de autocorrelación (**Arriba**) y sus correspondientes distribuciones de tamaño representativas de las micelas (**Abajo**) del formulado experimental conteniendo una concentración de 1.5 % p/v de tebuconazol, 4 % p/v de eugenol y 7.5 % p/v de Poloxamer 407. Las muestras hacen referencia al formulado experimental después de 3 meses de envejecimiento almacenadas a una temperatura de 25 °C.

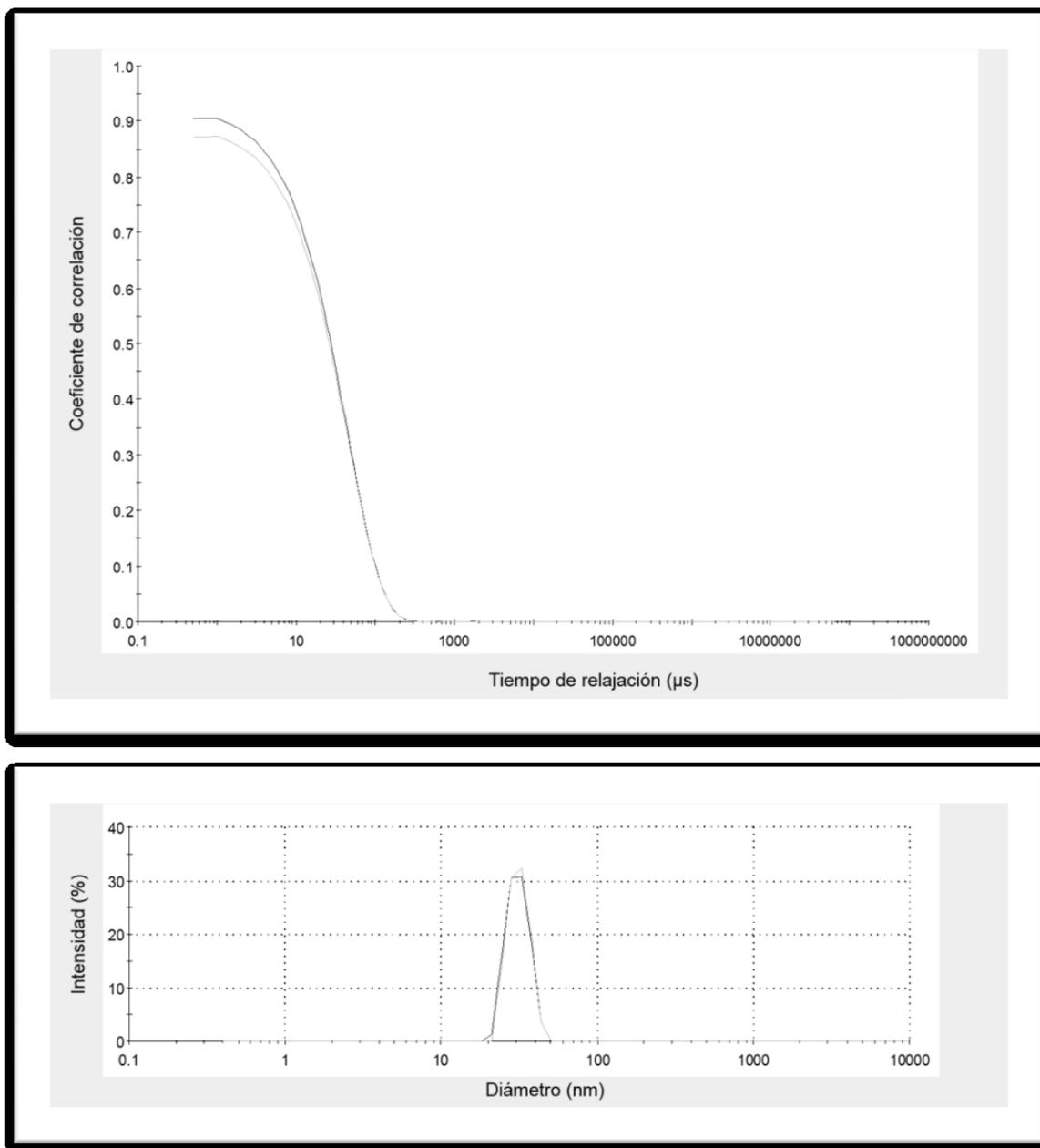


Funciones de autocorrelación (**Arriba**) y sus correspondientes distribuciones de tamaño representativas de las micelas (**Abajo**) del formulado experimental conteniendo una concentración de 1.5 % p/v de tebuconazol, 4 % p/v de eugenol y 7.5 % p/v de Poloxamer 407. Las muestras hacen referencia al formulado experimental después de 6 meses de envejecimiento almacenadas a una temperatura de 5 °C.

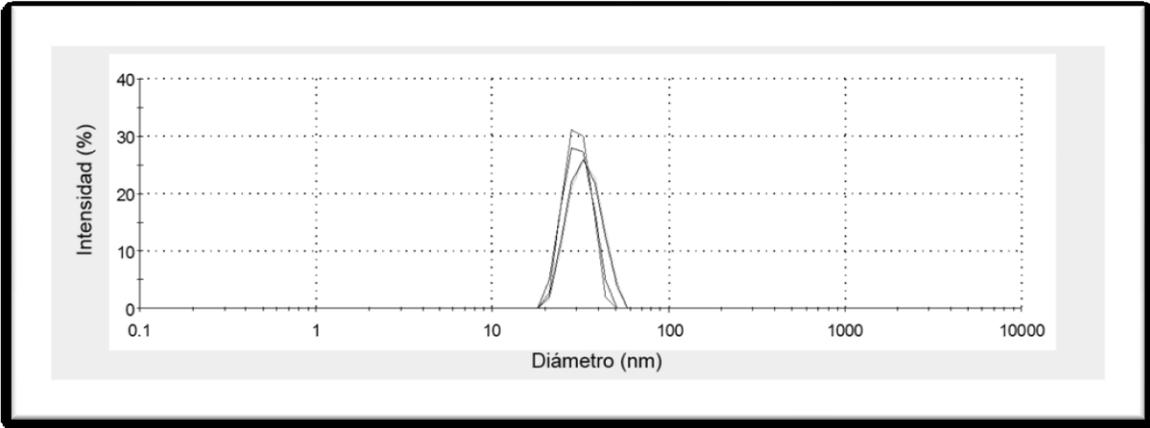
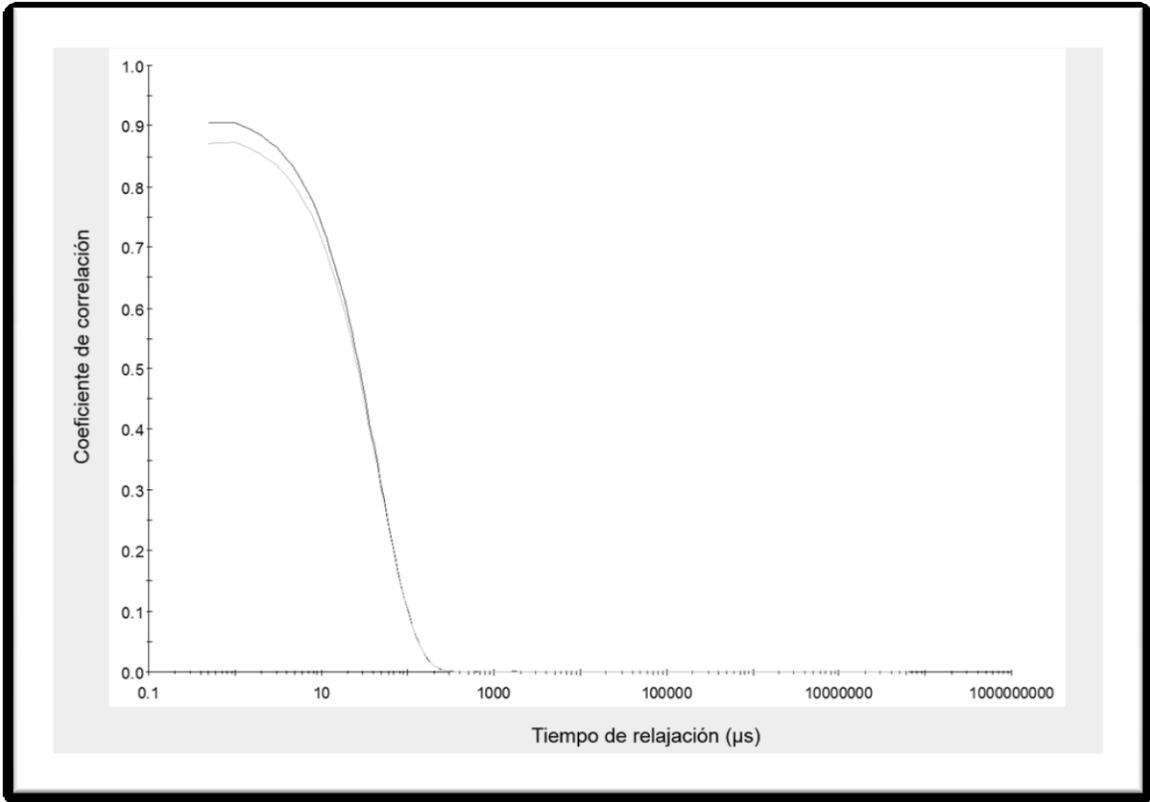


Funciones de autocorrelación (**Arriba**) y sus correspondientes distribuciones de tamaño representativas de las micelas (**Abajo**) del formulado experimental conteniendo una concentración de 1.5 % p/v de tebuconazol, 4 % p/v de eugenol y 7.5 % p/v de Poloxamer 407. Las muestras hacen referencia al formulado experimental después de 6 meses de envejecimiento almacenadas a una temperatura de 25 °C.

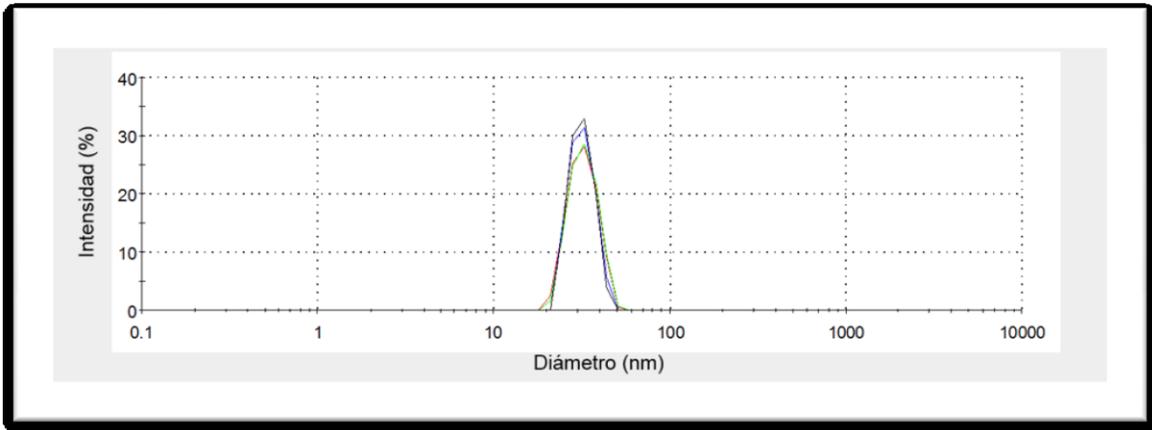
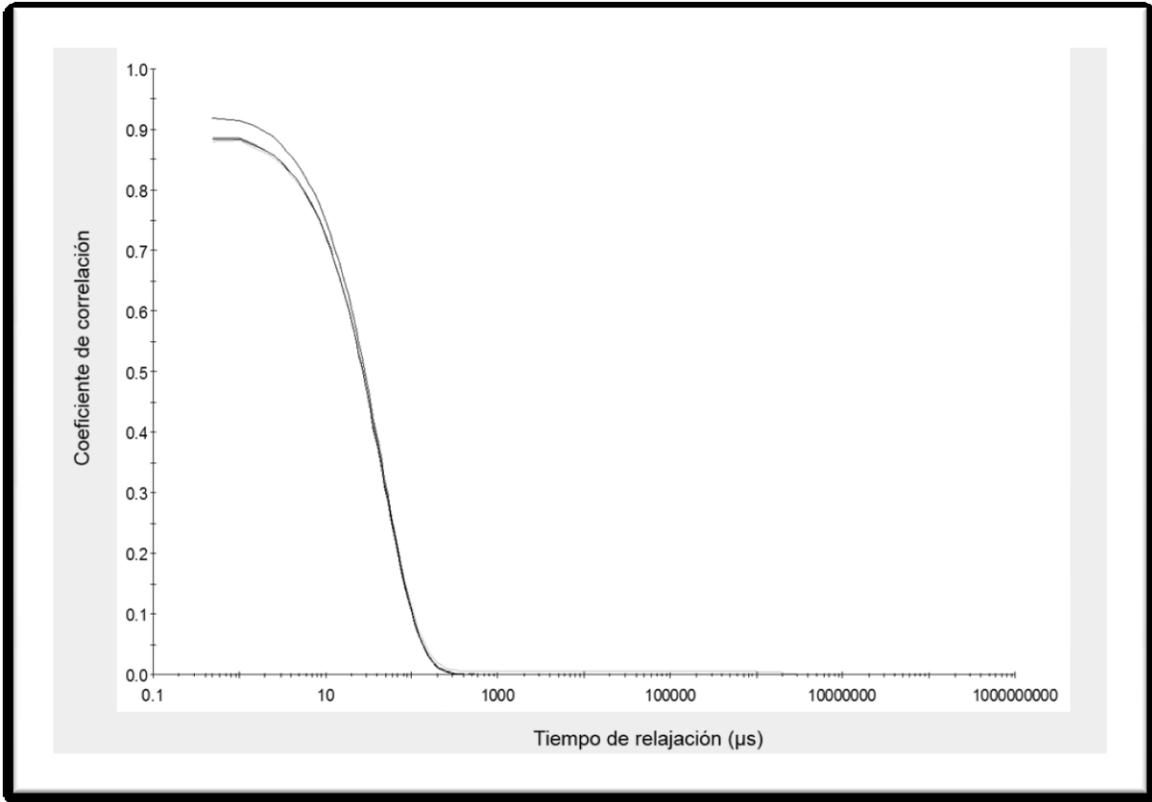
APÉNDICE 3



Funciones de autocorrelación (**Arriba**) y sus correspondientes distribuciones de tamaño representativas de las micelas (**Abajo**) de las diluciones del formulado experimental utilizadas para la impregnación (D1 y D2). Las muestras hacen referencia a la dilución del formulado experimental después de 24 hs de envejecimiento a temperatura ambiente.



Funciones de autocorrelación (**Arriba**) y sus correspondientes distribuciones de tamaño representativas de las micelas (**Abajo**) de las diluciones del formulado experimental utilizadas para la impregnación (D1 y D2). Las muestras hacen referencia a la dilución del formulado experimental después de 3 meses de envejecimiento a 5 y 25 °C.



Funciones de autocorrelación (**Arriba**) y sus correspondientes distribuciones de tamaño representativas de las micelas (**Abajo**) de las diluciones del formulado experimental utilizadas para la impregnación (D1 y D2). Las muestras hacen referencia a la dilución del formulado experimental después de 6 meses de envejecimiento a 5 y 25 °C.